

Aus der Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Norbert Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE KARDIALEN AUSWIRKUNGEN DER FYCO1-ÜBEREXPRESSION UND
DIE IDENTIFIKATION NEUER BINDUNGSPARTNER**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MAJA CHRISTIN MENKE
aus Bremen
Kiel (2019)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Frey, Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Adam, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2020

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 04.09.2020

gez.: Prof. Dr. Derk Frank, Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie und Angiologie
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Einleitung	1
1.1 Kardiale Hypertrophie	1
1.2 Autophagie	3
1.2.1 Makroautophagie.....	5
1.2.1.1 Induktion	6
1.2.1.2 Bildung einer Phagophore.....	7
1.2.1.3 Erkennung und Selektion der zu degradierenden Bestandteile	7
1.2.1.4 Fusion mit einem Lysosom und Degradation der Bestandteile	8
1.2.2 Mikroautophagie.....	8
1.2.3 Chaperon-vermittelte Autophagie	8
1.3 Autophagie und kardiale Auswirkungen	9
1.4 FYCO1	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.2 Chemikalien	18
2.1.3 Enzyme	19
2.1.4 Antikörper.....	19
2.1.4.1 Primärantikörper	19
2.1.4.2 Sekundärantikörper.....	19
2.1.5 Kits	19
2.1.6 Oligonukleotide	20
2.1.6.1 Primer zur Klonierung	20
2.1.6.2 Primer zur Sequenzierung	20
2.1.6.3 Primer zur Genotypisierung.....	20
2.1.6.4 Primer zur qRT-PCR.....	20
2.1.7 Vektoren und Plasmide	21
2.1.8 Puffer und Lösungen	21
2.1.9 Medien	23
2.1.10 Zelllinien	23
2.1.11 Versuchstiere	24
2.2 Methoden	24
2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	24
2.2.1.1 Herstellung von elektrokompenten Bakterien	24
2.2.1.2 Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation.....	24
2.2.1.3 Anzucht von Bakterien auf Selektivnährböden	25
2.2.1.4 Anzucht von Bakterien in Selektivmedium.....	25
2.2.2 Zellkulturmethoden.....	26
2.2.2.1 Kultur von HEK 293-A Zellen	26
2.2.2.2 Transfektion von HEK 293-A Zellen mit Plasmid-DNA	27

2.2.3	Molekularbiologische Arbeitsmethoden - DNA.....	27
2.2.3.1	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien	27
2.2.3.2	Extraktion von DNA aus Mausschwanzspitzen-Biopsien.....	28
2.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.3.4	Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	29
2.2.3.5	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)....	30
	Klonierungs-PCR.....	31
	Kolonie-PCR31	
	Genotypisierungs-PCR.....	32
2.2.3.6	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	33
2.2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	34
2.2.3.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
2.2.3.9	LR-Reaktion und Klonierung des MYH7-Expressionskonstruktes	35
2.2.3.10	Klonierung des transgenen Mausmodells.....	35
2.2.4	Molekularbiologische Arbeitsmethoden - RNA.....	36
2.2.4.1	RNA-Isolierung aus Gewebe mit QIAzol.....	36
2.2.4.2	cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase	37
2.2.4.3	Quantitative Real-time PCR	37
2.2.5	Molekularbiologische Arbeitsmethoden - Proteinbiochemie	39
2.2.5.1	Extraktion von Protein aus Zellen.....	39
2.2.5.2	Extraktion von Protein aus Gewebe	39
2.2.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	39
2.2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.5.5	Western Blot und Immunodetektion	41
2.2.5.6	Ecl-Detektionssystem.....	42
2.2.5.7	Co-Immunopräzipitation	42
2.2.6	Tierversuche	43
2.2.6.1	Haltung	43
2.2.6.2	Echokardiographie	43
2.2.6.3	Aortale Konstriktion der A. transversa (TAC).....	44
2.2.6.4	Gewebeentnahme.....	45
2.2.7	Histologie	45
2.2.7.1	Anfertigen von Kryostat-Gewebeschnitte	45
2.2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	46
2.2.7.3	Sirius Red/Fast Green Färbung	46
2.2.7.4	Immunhistochemie.....	46
2.2.8	Statistische Auswertung	47
2.2.8.1	Tests.....	47
2.2.8.2	Normalisierung.....	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Basischarakterisierung der Fyco1-TG Linien	48
3.1.1	Klonierung und Genotypisierung des neuen Mausmodells	48
3.1.2	Morphologischer Phänotyp der Fyco1-transgenen Mäuse.....	51
3.1.3	Echokardiographie der Basischarakterisierung.....	53
3.1.4	Fyco1-transgene Mäuse entwickeln größere Kardiomyozyten.....	54

3.1.5	Anzeichen einer erhöhten Expression des hypertrophen Genprogramms durch Fyco1-Überexpression.....	57
3.1.6	Die Überexpression von Fyco1 induziert die Autophagie.....	57
3.2	Charakterisierung von einjährigen Fyco1-transgenen Tieren.....	61
3.2.1	Fyco1-transgene Mäuse zeigen auch im Alter schwerere Herzen.....	62
3.2.2	Echokardiographie der gealterten Tiere.....	63
3.2.3	Vergleichbare Autophagie-Induktion durch Fyco1 im Alter von einem Jahr.....	64
3.2.4	Kein Anstieg der Hypertrophie-Gene im Alter.....	64
3.3	Aortale Konstriktion der Fyco1-TG x GFP-LC3-TG Linie.....	65
3.3.1	Morphologischer Phänotyp nach aortaler Konstriktion.....	65
3.3.2	Die Fyco1-Überexpression führt zu vergrößerten Herzen.....	67
3.3.3	Verbesserte Herzleistung durch Fyco1-Überexpression.....	68
3.3.4	Die Expression der Hypertrophie-Gene ist nach aortaler Konstriktion bei der Fyco1-Überexpression nicht verstärkt.....	71
3.3.5	Die Fyco1-transgenen Tiere exprimieren weniger β MHC nach aortaler Konstriktion.....	72
3.4	Fyco1-Bindungspartner.....	75
3.4.1	Co-Immunopräzipitation mit β MHC (MYH7).....	75
4	Diskussion.....	76
4.1	Fyco1-Überexpression und Autophagie-Induktion.....	76
4.2	Der Myosin-Isoformenwechsel bei der kardialen Hypertrophie.....	77
4.3	Die Fyco1-Interaktion mit β MHC (MYH7).....	80
4.4	Fyco1 und das hypertrophe Genprogramm.....	80
4.5	Der intrazelluläre Transport von Autophagosomen.....	82
5	Zusammenfassung.....	84
	Abstract.....	86
	Literaturverzeichnis.....	88
	Anhänge.....	97
	Abbildungsverzeichnis.....	97
	Tabellenverzeichnis.....	99
	Danksagung.....	100

Abkürzungsverzeichnis

A

ANP · Atriales natriuretisches Peptid
Atg · autophagy-related protein
ATG · AuTophagy-related gene
Atg11 · autophagy-related protein 11
Atg12 · autophagy-related protein 12
Atg14L · autophagy related 14 like protein
Atg16L · autophagy related 16-like protein
Atg19 · autophagy-related protein 19
Atg3 · autophagy-related protein 3
Atg4 · autophagy-related protein 4
Atg5 · autophagy-related protein 5
Atg7 · autophagy-related protein 7
Atg8 · autophagy-related protein 8

B

BNP · B-natriuretisches Peptid

C

C57BL/6NCrl · C57 black 6N mice from Charles
River Laboratories
CMA · chaperone mediated autophagy
Co-IP · Co-Immunopräzipitation

D

ddH₂O · Double-distilled water
DEPC · Diethylpyrocarbonat
DFCP1 · double FYVE-containing protein 1

E

EF · Ejektionsfraktion
EPG5 · ectopic P-granules autophagy protein 5
homolog
ER · Endoplasmatische Retikulum

F

FCS · fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FIP200 · FAK-family interacting protein of 200kDa
FITC · Fluorescein isothiocyanate
FS · Fractional Shortening
Fyco1 · FYVE and coiled-coil domain-containing 1
Fyco1-TG · Fyco1 transgene Maus

H

HEK293-A-Zellen · Human embryonic kidney cells
hGH1 · human growth hormone 1
Hsp70 · Hitzeschockprotein 70

I

IVSd · Interventricular septum in diastole
IVSs · Interventricular septum in systole

K

KFERQ · Pentapeptid aus Lysin, Phenylalanin,
Glutaminsäure, Arginin und Glutamin
KLP · Kern Lyse Puffer

L

LAMP-2A · lysosomal associated membrane protein
2a
LC3/ MAP1LC3 · microtubule-associated protein 1
light chain 3
LIR · LC3-interagierende Region
LVIDd · left ventricular internal diameter enddiastolic
LVIDs · left ventricular internal diameter endsystolic
LVPWd · Left Ventricular Posterior Wall in diastole
LVPWs · Left Ventricular Posterior Wall in systole

M

mAtg13 · mammilian Atg13
MHC · myosin heavy chain
mTORC1 · mammalian target of rapamycin
complex 1

N

NppA · Natriuretic peptide precursor A
NppB · Natriuretic peptide precursor B

O

OD_{595nm} · optische Dichte einer Suspension
gemessen bei 595 nm Wellenlänge
OD_{600nm} · optische Dichte einer Suspension
gemessen bei 600 nm Wellenlänge

P

PAS · Phagophore assembly site
PE · Phosphatidylethanolamin
PI3K · Klasse III Phosphatidylinositol-3-OH
Lipidkinase Vps34
PI3P · Phosphatidylinositol-3-OH-Phosphat
PSLAX · parasternal long axis
PtdIn3K · Klasse III Phosphatidylinositol 3-OH
Kinase

Q

qRT-PCR · quantitative Echtzeit-Polymerase-
Kettenreaktion

R

Rab7 · Ras-related protein Rab-7a
RCAN1 · regulator of calcineurin 1 isoform 4
RILP · Rab7-interacting lysosomal protein
Ripa-Puffer · Radioimmunoprecipitation assay
buffer
RPL32 · ribosomal protein L32
RT · Raumtemperatur

S

SAX · parasternal short axis
SDS · Natriumdodecyl-Sulfat
Sham-OP · Scheinoperation
SQSTM1 · sequestosome 1/ p62

T

TAC · transverse aortic constriction

U

ULK1 · uncoordinated-51-like kinase 1

V

v/v · volume per volume

W

w/v · weight per volume
WT · Wildtyp-Maus

1 Einleitung

1.1 Kardiale Hypertrophie

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen die Liste der häufigsten Todesursachen weltweit an. 2012 starben insgesamt 17,5 Millionen Menschen (das entspricht 31,25% aller Todesfälle) an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (World Health Organization 2012). Das statistische Bundesamt vermeldete in Deutschland für 2015 einen Anteil von 38,5% aller Todesursachen aufgrund von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Von den 925.200 verstorbenen Menschen, war die häufigste zum Tode führende Erkrankung die chronisch ischämischen Herzkrankheit (8,2%, Platz 1), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (5,3%, Platz 2) und der Herzinsuffizienz (5,1%, Platz 3). Die hypertensive Herzkrankheit führte bei 2,7% (Platz 7) der Menschen zum Tode (Statistisches Bundesamt 2015).

Diese Erkrankungen sind mit einer Hypertrophie des Myokards verbunden. Die Hypertrophie ist als Zunahme der Herzmuskelmasse durch eine Vergrößerung der Kardiomyozyten definiert. Dies erfolgt entweder physiologisch wie beispielsweise im Wachstum bei Kindern, bei Sportlern und während der Schwangerschaft oder pathologisch im Sinne einer konzentrischen Hypertrophie (Hill 2011). Die Herzhypertrophie ist zunächst meist eine adaptive Kompensation, kann jedoch bei langjähriger Nachlasterhöhung durch das sogenannte kardiale Remodeling in eine maladaptive Form übergehen. Klinisch äußert sich dies in einer Herzinsuffizienz mit normaler Ejektionsfraktion. Schließlich kann es zu einer Herzinsuffizienz mit eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion kommen (s. Abbildung 1-1). Die hypertensive Herzerkrankung kann mit beiden Arten der Herzinsuffizienz assoziiert sein. Das kardiale Remodeling ist histologisch durch eine Zellvergrößerung (Hypertrophie) der Kardiomyozyten, eine verstärkte Proteinsynthese und Fibrose, eine aufgehobene Sarkomerstruktur sowie durch eine Re-Expression fetaler Gene gekennzeichnet (Berk et al. 2007).

In der Framingham-Studie konnte gezeigt werden, dass eine linksventrikuläre Hypertrophie bei 16% aller Männer sowie 19% aller Frauen vorliegt. Als Risikofaktor gilt vor Allem der arterielle Hypertonus (>140 mmHg systolisch). Es zeigt sich außerdem eine starke und unabhängige Korrelation zwischen linksventrikulärer Hypertrophie zum Alter und Körpergewicht der Probanden sowie zu Klappenvitien oder einem stattgefundenen Herzinfarkt (Levy et al. 1988). Auch können intrinsische Stimuli wie Mutationen in den Genen des kontraktilen Apparates dazu beitragen, eine Hypertrophie im Sinne einer hypertrophen Kardiomyopathie zu entwickeln (Bonne et al. 1998). Dabei gilt die linksventrikuläre

Hypertrophie als unabhängiger Risikofaktor eine Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Ejektionsfraktion (EF) zu entwickeln (Drazner et al. 2004). Der persistierende Stress, den die erhöhte Nachlast und der daraus resultierende Sauerstoffmangel auf das Myokard ausübt, bewirkt über das kardiale Remodeling eine immer weitere Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion (LV-Funktion). Zudem ist das Risiko für das Auftreten maligner Herzrhythmusstörungen erhöht (Hill 2011).

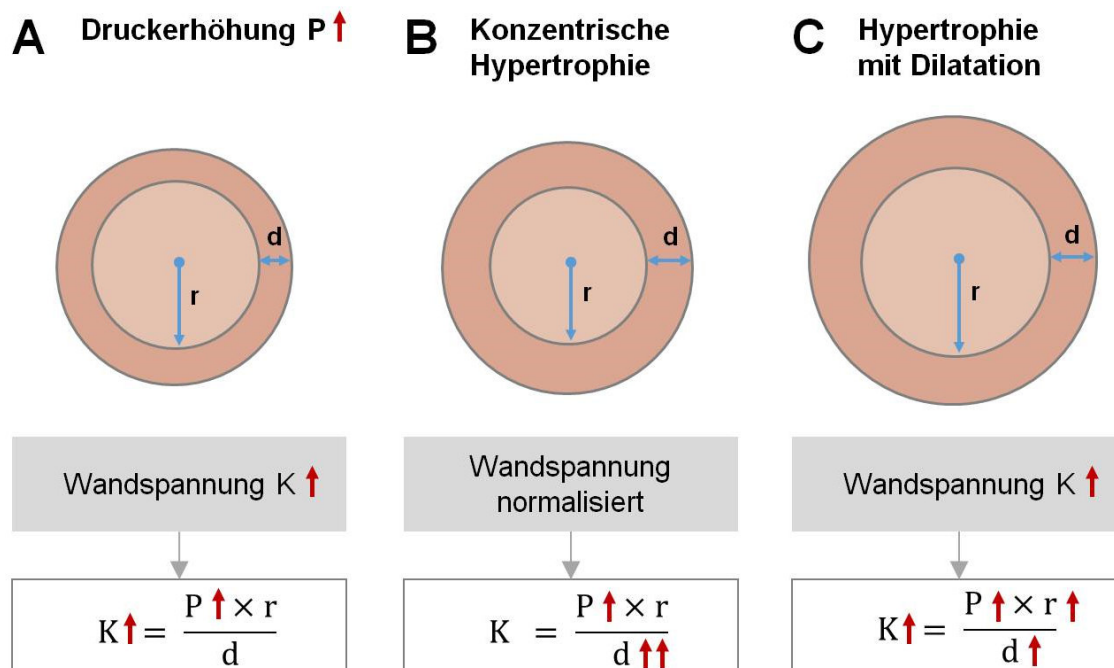


Abbildung 1-1: Herzmechanik nach Laplace.

Das Laplace-Gesetz beschreibt für Hohlgorgane den Zusammenhang von Wandspannung (K), der Wanddicke (d), dem Radius (r) und den auf sie einwirkenden Druck (P) als $K = (P \times r)/d$. **A.** Zunächst muss sich der Herzmuskel an den erhöhten Druck im Ventrikel anpassen. **B.** Diese adaptive Kompensation geschieht durch eine konzentrische Hypertrophie. Durch die verdickte Herzwand (d) kann die Wandspannung (K) normalisiert werden. **C.** Im Verlauf kommt es durch das sogenannte kardiale Remodeling zur maladaptiven Hypertrophie mit Dilatation durch Zunahme des Innendurchmessers (r). Diese exzentrische Hypertrophie hat eine wieder erhöhte Wandspannung zur Folge. Ein Circulus vitiosus entsteht.

Die daraus resultierende Herzinsuffizienz ist eine Erkrankung mit hoher Mortalität. Nach vier Jahren lebt nur noch die Hälfte der Patienten. Liegt eine schwere Herzinsuffizienz vor, sterben sogar mehr als die Hälfte der Patienten im ersten Jahr nach Diagnosestellung (Swedberg et al. 2005), sodass ein wichtiger klinischer Ansatz die Prävention der Herzinsuffizienz darstellt. Es ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse und von klinischer Relevanz, die molekulare Pathophysiologie dieses Remodelings zu erforschen, um möglichst frühzeitig eine geeignete Prävention einleiten und bisherige Therapien verbessern zu können. Ein neuer Ansatz besteht in dem Zusammenhang von kardialer Hypertrophie und verstärkter

Autophagie, einem Recycling-System der Zelle, welches durch Stressfaktoren induziert werden kann. Zunächst soll dieser Mechanismus vorgestellt werden, um die kardialen Zusammenhänge im Anschluss besser verständlich machen zu können.

1.2 Autophagie

Die Relevanz der Autophagie für einen gesunden Körper gewinnt erst in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung und ist aktueller denn je. So wurde Yoshinori Ohsumi erst 2016 für seine grundlegenden Entdeckungen über die entscheidenden Gene der Autophagie mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (Tsukada und Ohsumi 1993).

Es gibt zwei Abbauewege mit der die Zelle alte Proteine und Zellorganellen in ihre Einzelbestandteile zerlegen kann. Zum einen das Ubiquitin-Proteasom-System für einen selektiven Abbau einzelner, kurzlebiger Proteine und zum anderen das teils selektive, teils unselektive Autophagie-Lysosom-System. Letzteres wird auch als Autophagozytose (aus dem Altgriechischen für αὐτός autós „selbst“, φαγεῖν phagein „fressen“ und κύτος cýtos „Zelle“) bezeichnet. Dieser Mechanismus ist wichtig, um in gesunden Zellen die Homöostase zwischen einerseits dem Abbau alter Proteine, Ribosomen, Lipide und sogar Zellorganellen in einzelne Bestandteile und andererseits dem Aufbau neuer Proteine und Organellen aus diesen Bausteinen aufrecht zu erhalten (Klionsky und Emr 2000). Er dient der Zelle also als Recyclingsystem und Qualitätskontrolle, indem dysfunktionale oder falsch gefaltete Proteine entfernt werden. So kann auch die Lebenszeit des Proteoms (= Gesamtheit aller Zellproteine) beeinflusst und die Umsatzgeschwindigkeit den zellschädigenden Faktoren angepasst werden, um Fehlfunktionen frühzeitig zu vermeiden (Goldberg 2003). Diese Funktion macht eine basale Rate an Autophagie elementar wichtig für eine physiologische Funktion der Zellen (Nemchenko et al. 2011). Besonders wichtig ist diese Kontrolle in postmitotischen Zellen, wie den Kardiomyozyten.

Es gibt einige Faktoren, die die Autophagie verstärken. Dazu zählen vor Allem Hungern, aber auch eine Ischämie oder Bluthochdruck (Kuma et al. 2004) (Mizushima et al. 2004) (Matsui et al. 2007) (Zhu et al. 2007). Dabei gilt Hungern als stärkster Induktor: Endprodukt des Autophagie-Lysosom-Systems sind die Einzelbausteine der Proteine – die Aminosäuren. Diese hemmen die Autophagie durch negative Rückkopplung. Liegt durch längeres Hungern ein Aminosäuremangel vor, wird die Autophagie weniger stark gehemmt (Nicklin et al. 2009) (s. Kapitel 1.2.1.1). Wann die Induktion der Autophagie adaptiv ist und das Zellüberleben unter Stress sichert oder maladaptiv ist und die Entwicklung einer Erkrankung unterstützt, ist jedoch noch unzureichend erforscht (Hill 2011) (s. Abbildung 1-3).

Dabei lassen sich drei Formen der Autophagozytose unterscheiden: Die Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelte Autophagie (s. Abbildung 1-2). Erstere ist vermutlich der wichtigste und am besten erforschte Mechanismus. Im weiteren Verlauf wird die Makroautophagie daher vereinfachend als Autophagie bezeichnet.

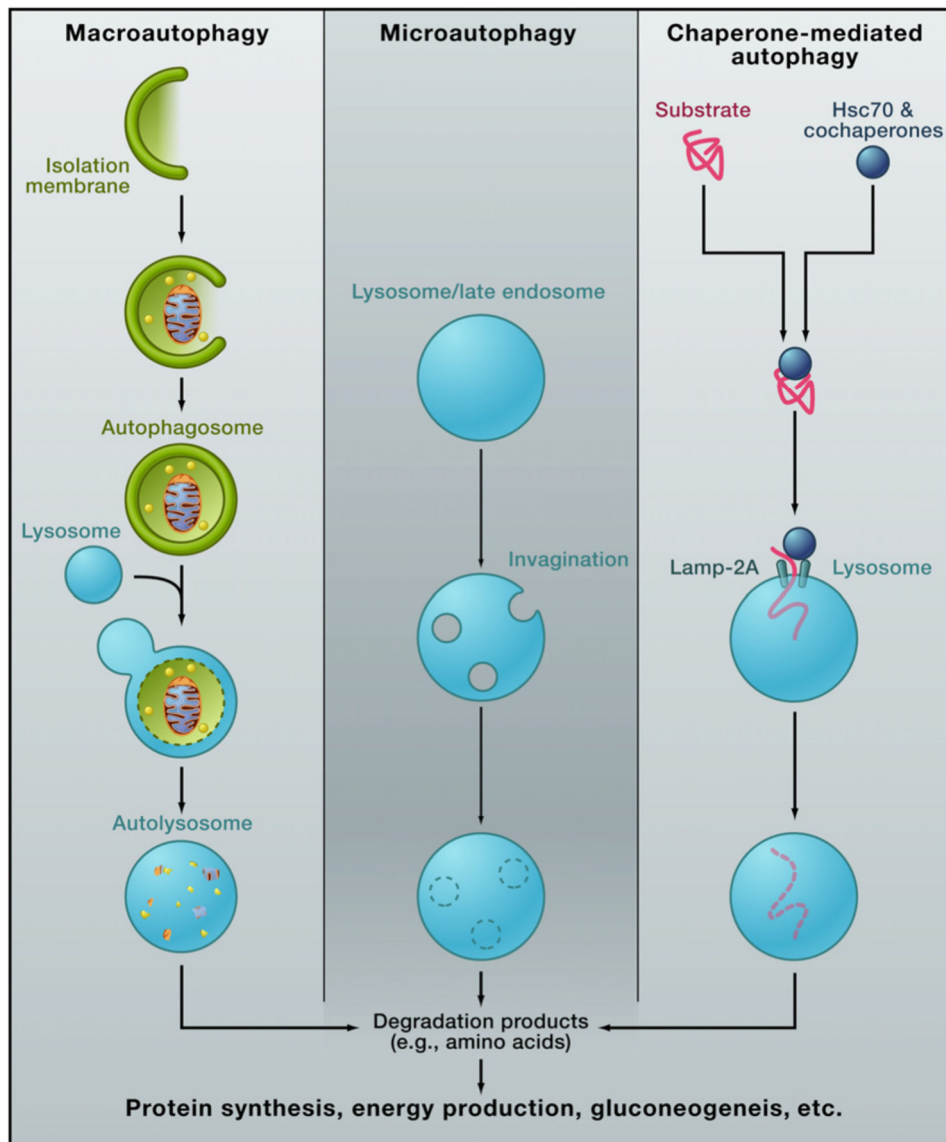


Abbildung 1-2: Verschiedene Mechanismen der Autophagie (Mizushima und Komatsu 2011).

Bei der Makroautophagie werden die Zellbestandteile über eine Isolierungsmembran mit Doppelmembran eingeschlossen und als Autophagosom nach Verschmelzen mit einem Lysosom abgebaut. Bei der Mikroautophagie werden kleinere Bestandteile über Endozytose direkt in das Lysosom aufgenommen. Proteine, die über die chaperon-vermittelte Autophagie abgebaut werden, werden vom Lysosom anhand ihrer Hitzeschockproteine (Hsp70) erkannt und aufgenommen.

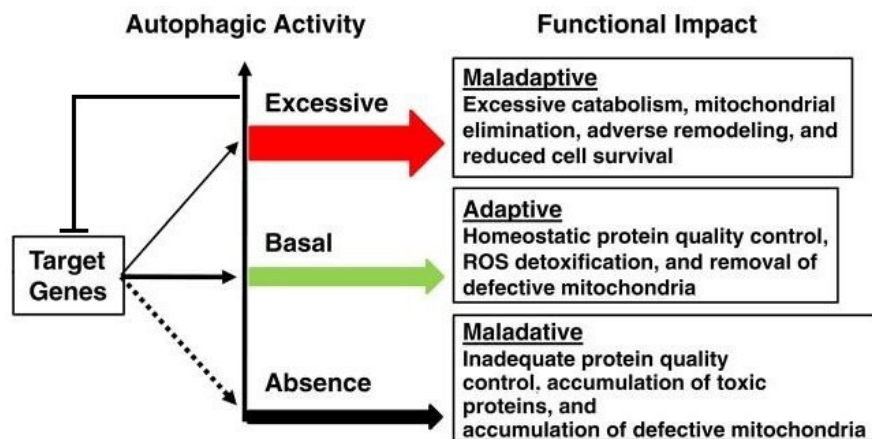


Abbildung 1-3: Autophagie Aktivität und ihre Auswirkungen (Ferdous et al. 2010).

Viele verschiedene Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression der Autophagie-Proteine und können durch selbige über eine negative Rückkopplung gehemmt werden. Dadurch soll eine überschießende oder abwesende Autophagie-Aktivität verhindert werden. Eine basale Autophagie-Rate ist für die Zelle als Qualitätskontrolle und Recyclingsystem wichtig und wird als adaptive Anpassung an verschiedene Stimuli verstanden. Eine abwesende Autophagie führt zur Akkumulation von defekten/ toxischen Proteinen und Mitochondrien. Andererseits ist eine exzessive Autophagie von Katabolismus und verringertem Zellüberleben gekennzeichnet. Beide Formen sind als maladaptiv anzusehen.

1.2.1 Makroautophagie

Die Makroautophagie ist gekennzeichnet durch den Abbau großer zytoplasmatischer Organellen und Proteine mittels eines Vesikels mit Doppelmembran. Diese sogenannte Phagophore teilt die Ladung vom restlichen Zytosol, reift zu einem Autophagosom heran und fusioniert mit einem Lysosom zu einem Autophago-Lysosom, sodass die Zellbestandteile enzymatisch aufgespalten werden können (Mizushima und Komatsu 2011). Mithilfe der autophagie-spezifischen Gene (*ATG* = AuTophagy-related Genes), die für die Atg-Proteine kodieren, werden die Autophagosomen geformt. Diese Gene wurden zuerst in der Hefe entdeckt und sind im Vergleich zu anderen Eukaryonten – inklusive Säugetieren – hochkonserviert. Aktuell sind über 35 Atg-Proteine bekannt. Dabei spielen vor Allem die sogenannten core-Proteine (Atg1-10, 12-14, 16, und 18) eine wichtige Rolle bei der Bildung eines Autophagosoms (Nakatogawa et al. 2009) (s. Abbildung 1-4). Dieser Prozess gliedert sich in die Abschnitte Induktion, Bildung einer Phagophore, Erkennung und Selektion der zu degradierenden Bestandteile, Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom, Degradation der Bestandteile und die Freisetzung der Einzelbausteine in das Zytosol (Huang und Klionsky 2007).

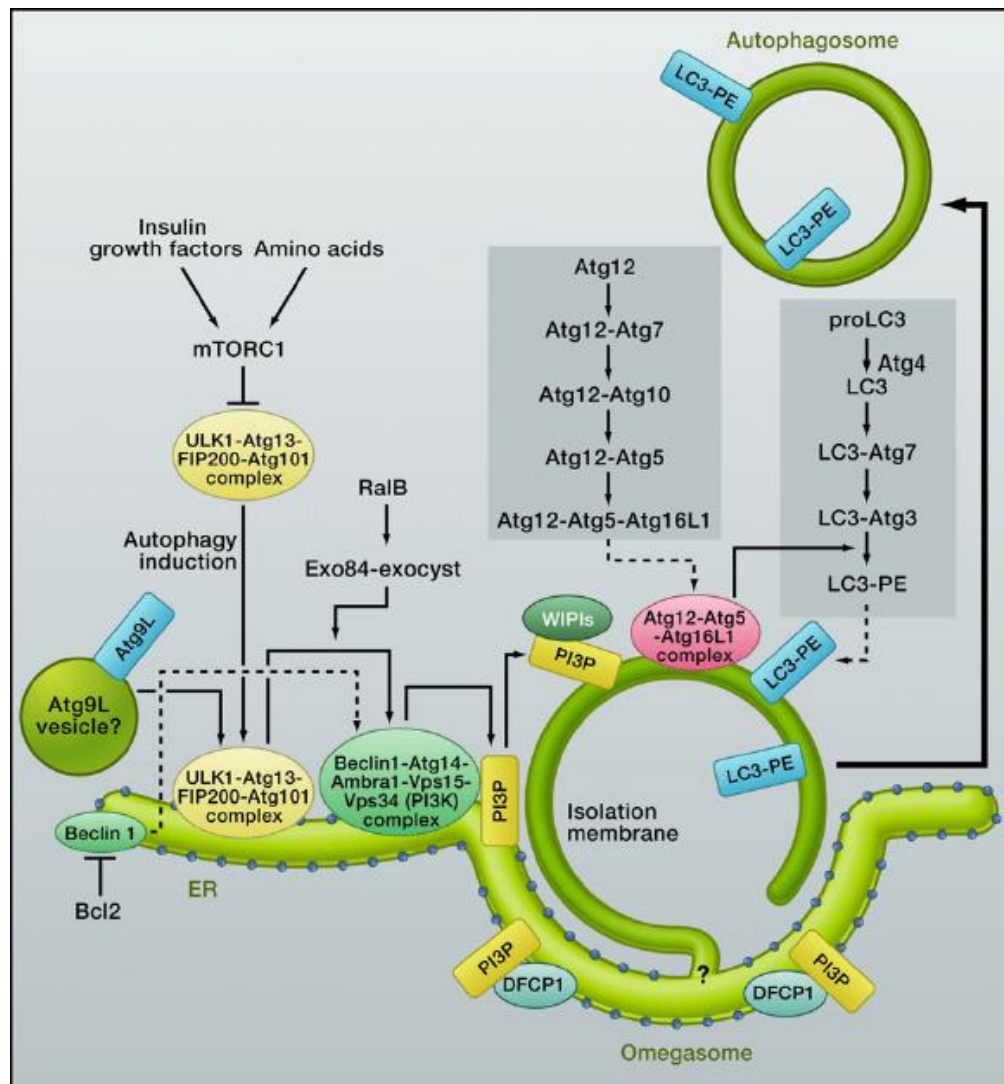


Abbildung 1-4: Die Bildung eines Autophagosoms (Mizushima und Komatsu 2011).

Aminosäuren und Insulin regulieren den mTORC1-Komplex, sodass die Autophagie bei nährstoffreichen Bedingungen weitgehend unterbunden wird. Fallen diese Stimuli weg, dissoziiert der ULK1-Komplex vom mTORC1-Komplex und transloziert an die Membran des ER. Dort reguliert er über den PtdIn3K-Komplex die Bildung von PI3P. Durch Anlagerung von DFCP1 an PI3P wird an der PAS-ähnlichen Struktur des ER ein Omegasom mit Doppelmembran formiert. Durch kovalente Bindung von LC3-I und PE zu LC3-II gelangt Letzteres in die Doppelmembran der Phagophore und spielt eine wichtige Rolle für die Elongation und das Schließen der Doppelmembran zu einem Autophagosom.

1.2.1.1 Induktion

Die Autophagie wird durch äußere Faktoren wie Hunger/-Aminosäuremangel initiiert und über den mTORC1-Komplex (mammalian target of rapamycin complex 1) reguliert. Unter normalen Bedingungen wird der ULK1-Komplex (uncoordinated-51-like kinase 1 ist ein Atg1-Ortholog der Hefe in Säugetieren) durch die Anwesenheit von Aminosäuren und Insulin an den mTORC1 gebunden und damit inaktiviert. Er umfasst die Proteine mAtg13 (mammalian

Atg13), FIP200 (FAK-family interacting protein of 200 kD) und Atg101. Bei einem Aminosäuremangel durch beispielsweise Hungern dissoziiert der ULK1-Komplex durch verschiedene Phosphorylierungen vom mTORC1 und transloziert an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) (Yang und Klionsky 2010) (s. Abbildung 1-4). Außerdem sind der Golgi-Apparat, die Mitochondrien und die Plasmamembran an der Bildung einer Autophagosomen-Membran beteiligt (Hailey et al. 2010) (Tooze und Yoshimori 2010).

1.2.1.2 Bildung einer Phagophore

Die Bildung einer Phagophore mit Doppelmembran, aus der das spätere Autophagosom hervorgeht, findet am Endoplasmatischen Retikulum an einer PAS-ähnlichen (Phagophore assembly site) Struktur statt. Durch die Bindung des ULK1-Komplexes an das ER wird der Klasse III Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PtdIn3K)-Komplex reguliert. Letzterer beinhaltet die Proteine Beclin-1 (Atg6-Ortholog der Hefe in Säugetieren), Atg14L (Atg14 like protein-)/Barkor, Ambra1, Vps15 und die Klasse III PtdIns3-Lipidkinase Vps34 (PI3K). Normalerweise ist Beclin-1 an Bcl2 gebunden und damit inaktiv. Erst bei Mangelzuständen dissoziiert es an die Membran des ER um zum PtdIn3K-Komplex zu formieren. Die Lipidkinase Vps34 generiert PI3P, um DFCP1 (double FYVE-containing protein 1) anlagern zu können. Daraus formiert sich am ER eine becherförmige Ausstülpung (Omegasom) aus der die Phagophore (Isolierungsmembran) gebildet wird. Für die Formation, Elongation und das Schließen der Phagophorenmembran spielen das zytosolische LC3-I (MAP1LC3 = microtubule-associated protein 1 light chain 3) und das PE (Phosphatidylethanolamin) eine wichtige Rolle. LC3 ist das Atg8-Homolog der Hefe in Säugetieren (Tanida et al. 2004). LC3 und PE werden von Atg4, Atg7 und Atg3 gebildet, von dem Atg12-5-16L1-Komplex zum lipidierten LC3-II kovalent verknüpft und an die Doppelmembran des Autophagosoms transloziert (Kabeya et al. 2000) (s. Abbildung 1-4). So kann vermutlich die Größe des Autophagosoms determiniert werden (Xie et al. 2008). Deshalb wird das lipid-verknüpfte LC3-II als Möglichkeit genutzt, das Autophagie-Niveau quantitativ zu bestimmen (He und Klionsky 2009).

1.2.1.3 Erkennung und Selektion der zu degradierenden Bestandteile

Spezielle Rezeptorproteine erkennen durch Interaktion die zu degradierenden Bestandteile. In der Hefe werden diese über Atg19 erkannt, mittels Atg11 zur Phagophore rekrutiert und von Atg8 in das Autophagosom aufgenommen (Shintani et al. 2002). Neuere Studien vermuten, dass in Säugetieren diese Selektion über das zytosolische Ubiquitin-Proteasom-System mittels p62/sequestosome 1 (SQSTM1) funktioniert (Bjorkoy et al. 2005). Eine funktionelle und strukturelle Verwandtschaft legt die Vermutung nahe, dass es sich beim p62 und ein Homolog

des Atg19 der Hefe handeln könnte (Noda et al. 2008). Zudem bindet p62 sowohl Ubiquitin als auch das Atg8-Homolog LC3 (Pankiv et al. 2007).

1.2.1.4 Fusion mit einem Lysosom und Degradation der Bestandteile

Nachdem die Bildung des Autophagosoms abgeschlossen ist, wird in der Hefe das lipidierte Atg8 an der äußeren Membran des Autophagosoms mittels Atg4 vom PE gelöst und transloziert zurück ins Zytosol (Kirisako et al. 2000). Um nun mit einem Lysosom verschmelzen zu können, wird das Autophagosom entlang der Mikrotubuli von perinukleär in die Zellperipherie transportiert. Dabei könnte Fyco1 als Bindeprotein zwischen den Autophagosomen und den Kinesinen fungieren und den Transport der Autophagosomen entlang der Mikrotubuli zum plus-Ende unterstützen, da es eine potentielle Bindungsstelle für Kinesine aufweist. Unklar bleibt, welche Funktion Fyco1 in der Zellperipherie ausübt. An den membranständigen Proteinen PI3P, LC3 und der GTPase Rab7 des Autophagosoms ist die Bindung von Fyco1 bereits bestätigt (Pankiv und Johansen 2010) (Pankiv et al. 2010) (s. Abbildung 1-7). Um miteinander zu verschmelzen, werden bei Säugetieren zum einen die GTPase Rab7 und zum anderen das lysosomale Membranprotein LAMP-2 benötigt (Jager et al. 2004). Dabei verschmilzt nur die äußere Membran des Autophagosoms mit der einfachen Membran des Lysosoms. Anschließend erfolgt der Abbau der Zellbestandteile mittels lysosomaler Enzyme, wie den sauren Hydrolasen Proteinase A und B, Lipasen und Cathepsin B, D und L (Tanida et al. 2005). Die Einzelbausteine werden zurück ins Zytosol transportiert, um dort bei der Translation neuer Proteine zur Verfügung zu stehen. So kann die Zelle trotz eines Mangelzustandes eine physiologische Funktion aufrechterhalten.

1.2.2 Mikroautophagie

Bei der Mikroautophagie hingegen werden kleinere Zellbestandteile direkt über Endozytose in das Lysosom aufgenommen. Durch Membraneinstülpungen des Lysosoms werden die Bestandteile eingeschlossen und nach Abschnürung der Vesikel intralysosomal abgebaut. Dadurch wird die Ausdehnung der lysosomalen Membran nach Fusion mit einem Autophagosom kompensiert sowie die Zahl der Peroxisomen im Zytosol kontrolliert (Sakai et al. 1998).

1.2.3 Chaperon-vermittelte Autophagie

Bei der Chaperon-vermittelte Autophagie (chaperone mediated autophagy, CMA) werden einzelne Substrate von einem Hitzeschockprotein (Hsp70) anhand spezifischer Pentapeptide (KFERQ-ähnlich) erkannt. Die Bindung von Substrat, Hsp70 und weiteren Co-Chaperonen wird an der Lysosommembran durch das lysosomal associated membrane protein 2a

(LAMP-2A) erkannt und in das Lumen des Lysosoms transloziert (Mizushima und Komatsu 2011). Anschließend wird das Substrat von den lysosomalen Proteasen verdaut.

1.3 Autophagie und kardiale Auswirkungen

Die Autophagie scheint insbesondere am Herzen ein wichtiger Regulationsmechanismus zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die kardiale Autophagie-Aktivität bei Mäusen in der neonatalen Hungerphase sowie durch experimentellen Nahrungsentzug signifikant anstieg (Kuma et al., 2004, Mizushima et al., 2004, Kanamori et al., 2009). Andererseits zeigen Mausmodelle, dass ohne Autophagie kein Überleben der Embryonal- oder Neonatalphase möglich ist. Beispiele sind der systemische Knockout von Autophagie-relevanten Genen, wie Beclin-1 (Qu et al. 2003), Atg5 (Kuma et al. 2004) und Atg7 (Komatsu et al. 2005) (s. Abbildung 1-5).

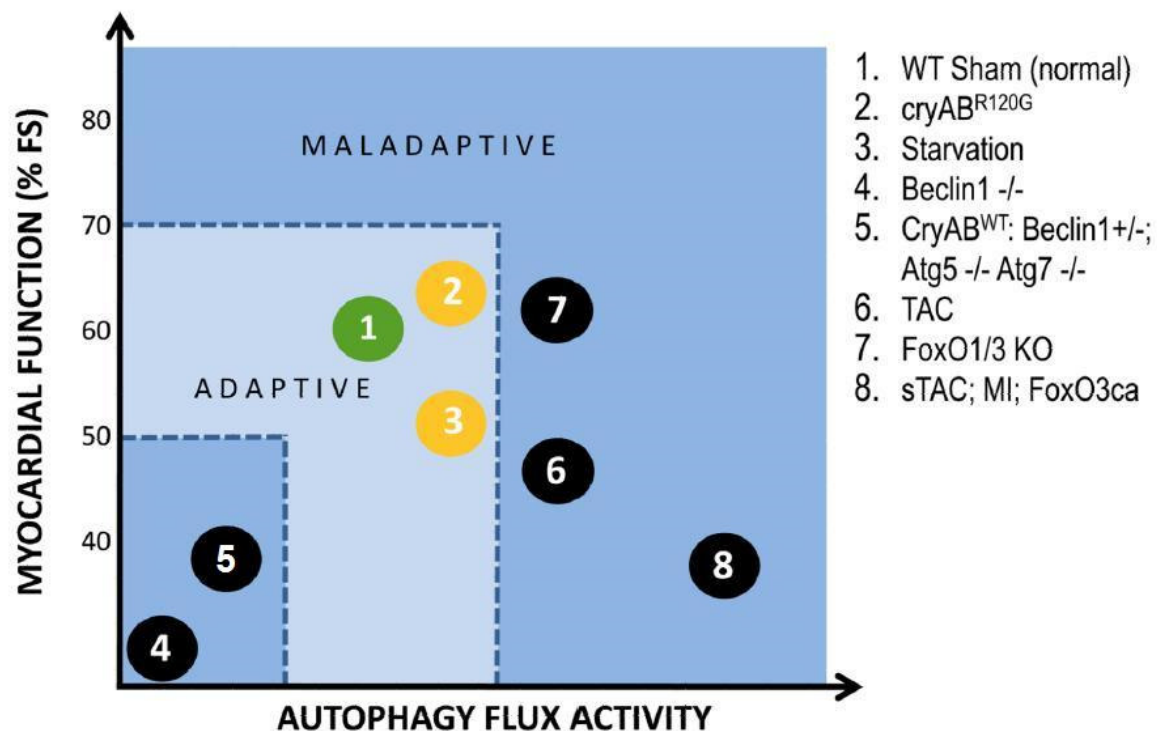


Abbildung 1-5: Beziehung von Autophagie-Aktivität und myokardialer Funktion (Nemchenko et al. 2011).

Dieses Schaubild zeigt die Relation der veränderten myokardialen Funktion (ausgedrückt als Fractional shortening, FS in [%]) im Verhältnis zum autophagischen Flux in verschiedenen Mausmodellen und Experimenten. **1)** Wildtyp mit Scheinoperation (normal); **2)** α B-Crystallin Mutante; **3)** Hungern – 48 Stunden ohne Nahrung; **4)** Beclin-1 Knockout; **5)** Überexpression eines α B-Crystallin-WT; heterozygote Beclin-1 defiziente Mäuse; Knockout von Atg5/ Atg7; **6)** Nachlasterhöhung durch transaortale Konstriktion; **7)** Knockout von FoxO1/ FoxO3 (Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Box-Proteine); **8)** schwere transaortale Konstriktion; Myokardinfarkt in Wildtyp-Mäusen induziert durch Ligation des Ramus interventricularis anterior; Konsitutive Überexpression von FoxO3.

In adulten Mäusen kann die Autophagie durch Bafilomycin A1 pharmakologisch gehemmt werden. Es inhibiert die Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom. Mäuse, die gehungert haben und denen Bafilomycin A1 appliziert wurde, zeigten eine signifikant schlechtere Herzfunktion sowie eine linksventrikuläre Dilatation (Kanamori et al. 2009). Ebenso verhält es sich bei einem Mausmodell, bei dem mittels Applikation von Tamoxifen eine induzierbare Reduktion von Atg5 erreicht werden kann. Dies resultiert in einem verminderten Fractional Shortening der Tamoxifen-behandelten Mäuse. Allerdings zeigen Mäuse, bei denen Atg5 herzmuskelspezifisch während der Kardiogenese ausgeschaltet ist, keine verschlechterte Herzfunktion im Erwachsenenalter. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass es alternative Signalwege in der Autophagie gibt, welche die kurzzeitige Atg5-Reduktion kompensieren können (Nakai et al. 2007).

Bei einer Nachlasterhöhung wie der arteriellen Hypertonie, wird durch die Entwicklung einer kompensatorischen Hypertrophie die Wandspannung normalisiert (s. Kapitel 1.1, Abbildung 1-1). Diese ist initial adaptiv und geht ohne Fibrose einher (Swynghedauw 1999). Dieser Vorgang kann in adulten Mäusen durch eine moderate operative Konstriktion des Aortenbogens (moderate TAC) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren simuliert werden. Die einzelne Herzmuskelzelle vergrößert ihr Zellvolumen vermutlich durch eine verstärkte Proteinbiosynthese und eine verminderte Autophagie-Aktivität eine Woche nach moderater TAC (siehe Abbildung 1-6). Ebenso verhält es sich bei der Nachlasterhöhung durch β -adrenerge Stimulation. Diese führt zu einer Hypertrophie bei inhibierter Autophagie (Pfeifer 1987). Vier Wochen nach moderater TAC zeigt sich jedoch eine erhöhte Autophagie-Aktivität und durch voranschreitendes kardiales Remodeling die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, die mit Fibrosebildung einhergeht (Nishida et al. 2009).

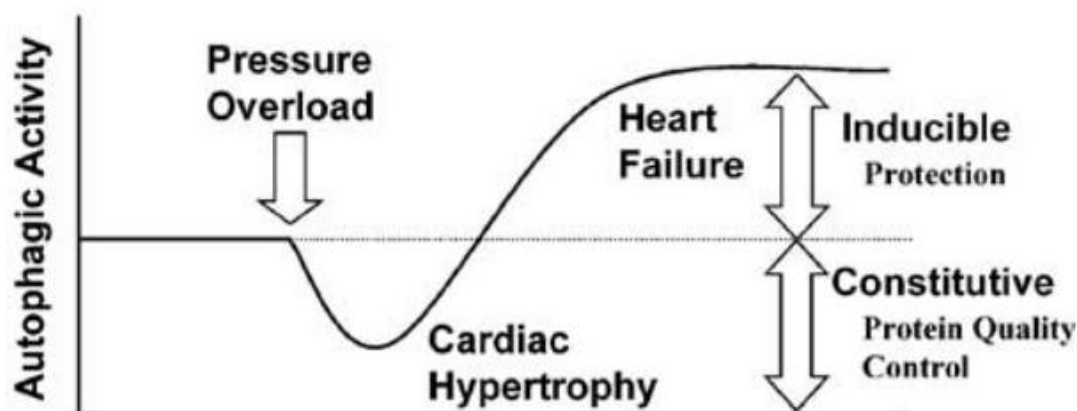


Abbildung 1-6: Autophagie-Aktivität bei moderater Nachlasterhöhung (Nishida et al. 2009).

Basale Autophagie ist notwendig, um die Qualitätskontrolle der Proteine und eine normale Sarkomerstruktur und -funktion aufrechtzuerhalten. In Mäuseherzen zeigte sich eine Woche nach moderater TAC die reaktive Entwicklung einer kompensatorischen kardialen Hypertrophie sowie eine Abnahme der Autophagie-Aktivität. Beim

Übergang in das Stadium der Herzinsuffizienz nach vier Wochen durch persistierende Nachlasterhöhung zeigte sich eine verstärkte Autophagie-Aktivität. Vermutlich um die schädlichen Proteine und defekten Organellen zu entfernen und damit die kardiale Funktion zu gewährleisten.

Anders als die moderate TAC, induziert die schwerwiegende TAC (severe TAC) die Autophagie bereits nach 24 Stunden und hält bis zu zwei Wochen an. So zeigten heterozygote Beclin-1-defiziente Mäuse drei Wochen nach schwerwiegender TAC mit einer reduzierten Autophagie-Aktivität eine signifikant bessere Herzfunktion bei vergleichbarer kompensatorischer Hypertrophie im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Zhu et al. 2007). Umgekehrt zeigten Beclin-1-transgene Mäuse drei Wochen nach moderater TAC, dass eine verstärkte Autophagie-Aktivität mit einer linksventrikulären Dilatation und LV-Dysfunktion einhergeht. Eine andere Studie zeigte einen gegenteiligen Effekt: Atg5-defiziente Mäuse, deren Knockout von Atg5 ab dem achten Embryonaltag einsetzt, hatten ein vergleichsweise schlechteres Fractional Shortening nach TAC als die Wildtyp-Mäuse (Nakai et al. 2007), verbunden mit einer verminderten Autophagie-Aktivität. Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe, die in Kapitel 1.4 erläutert werden, weisen ebenfalls in diese Richtung. Fyco1-Knockout Mäuse hatten mit einer reduzierten Autophagie-Aktivität ein vermindertes Fractional Shortening nach TAC im Vergleich zu den operierten Wildtyp-Mäusen (Kuhn et al. 2012). Umgekehrt zeigt die Gabe von Rapamycin, welches den mTOR-Komplex hemmt und so die Autophagie induziert, sogar einen Rückgang der kardialen Hypertrophie nach Druckbelastung des Herzens (McMullen et al. 2004) (Ha et al. 2005). Dieses sogenannte reverse Remodeling, welches die Progression des kardialen Umbaus hemmen oder gar umkehren soll, könnte einen wichtigen therapeutischen Ansatz darstellen. So vermutet man in der frühzeitigen Hochregulation der Autophagie-Aktivität eine Möglichkeit, die kardiale Hypertrophie rückgängig machen zu können und so der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken.

Interessant ist, dass auch bei Menschen, die an einer dilatativen Kardiomyopathie leiden, eine Akkumulation von Autophagosomen nachgewiesen werden konnte (Kostin et al. 2003). Außerdem gibt es Mutationen in den Autophagie-Genen, die für die Entwicklung einer Kardiomyopathie verantwortlich sein könnten. Beispiele sind die Danon-Erkrankung, der ein LAMP-2-Mangel zugrunde liegt (Nishino et al. 2000) und das Vici-Syndrom mit Mutationen im EPG5 (ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog) (Cullup et al. 2013). EPG5 ist an der Bildung der Lysosomen beteiligt. Das Vici-Syndrom ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit einer Agenesie des Corpus callosum, Albinismus, beidseitigem Katarakt, kombinierter Immundefizienz und Kardiomyopathie einhergeht. Außerdem leiden die Betroffenen an einer psychomotorischen Retardierung und muskulären Hypotonie aufgrund einer Myopathie (Finocchi et al. 2012). Die Danon-Erkrankung hingegen wird X-chromosomal

vererbt und zeigt sich in der klinischen Trias einer Skelettmuskelschwäche, einer hypertrophen Kardiomyopathie und einer mentale Retardierung (Cheng und Fang 2012). In entsprechenden Mausmodellen zum Vici-Syndrom (Zhao et al. 2013) und der Danon-Erkrankung (Tanaka et al. 2000) konnte auch im Skelettmuskel eine gestörte Autophagie nachgewiesen werden.

1.4 FYCO1

FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain containing 1) ist ein bisher wenig charakterisiertes Protein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es weitestgehend herz- und skelettmuskelspezifisch exprimiert wird (Kiss et al. 2002). Außerdem bindet es als Dimer an die autophagosomalen, membranständigen Proteine PI3P, Rab7 und über eine C-terminale LC3-interagierende Region (LIR) mit LC3 (Olsvik et al. 2015) (Pankiv et al. 2010). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es in der Autophagie eine wichtige Rolle als Bindungsprotein zwischen den Plus-End-Motorproteinen (Kinesinen) der Mikrotubuli und den Autophagosomen spielen könnte, da es für Kinesine eine potentielle Bindungsstelle aufweist (Pankiv et al. 2010) (s. Abbildung 1-7). Außerdem führt die Überexpression von FYCO1 zur Umverteilung von LC3 und Rab7-ähnlichen Strukturen in die Zellperipherie vergleichbar mit dem Mikrotubuli-assoziierten Transport (Pankiv und Johansen 2010).

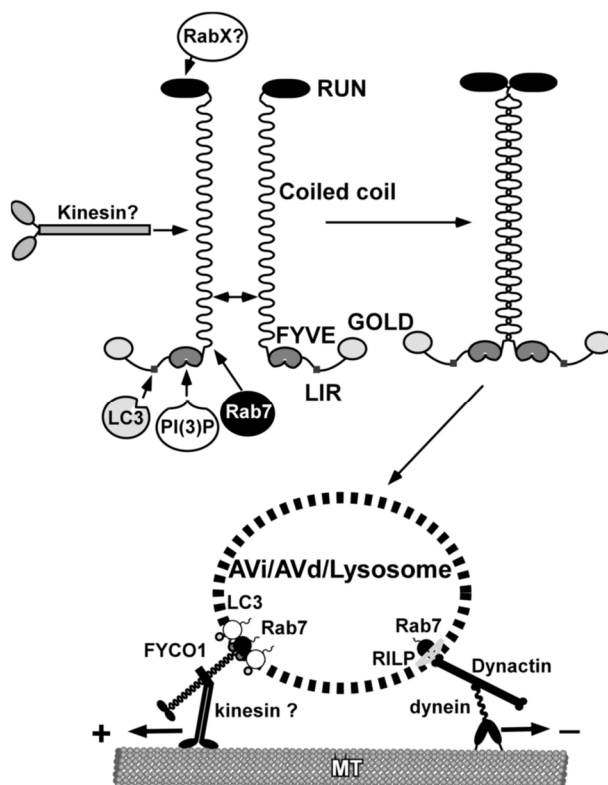


Abbildung 1-7: Mögliche FYCO1-Funktion als Bindungspartner der Kinesine (Pankiv et al. 2010).

FYCO1 hat eine N-terminale RUN-Region mit möglicher Bindungsstelle für Proteine der Rab-Familie. Die CC-Region (Coiled coil) weist eine potentielle Bindungsstelle der Kinesine auf und ist verantwortlich für die Dimerisierung von FYCO1. Im C-terminalen Cluster (FYVE, GOLD) wurden die Interaktionen zu LC3, PI3P und Rab7 nachgewiesen. Rab7 interagiert über RILP mit Dynactin/ Dynein für einen Minus-End gerichteten Transport.

In einem von unserer Arbeitsgruppe generierten *Fyco1*-Knockout Mausmodell wurden die homozygot defizienten Mäuse mit den Wildtyp-Geschwistertieren verglichen. Nach Induktion

der Autophagie durch einen Hungerversuch von 48 Stunden ohne Futter, zeigte sich bei den Wildtyp-Mäusen in der Echokardiographie eine normale Herzfunktion. Die Herzfunktion der *Fyco1*-defizienten Mäuse war jedoch signifikant schlechter. Quantitativ wurde die Autophagie über das Expressionsniveau von LC3-II im Western Blot bestimmt. Dies nahm bei den Wildtyp-Mäusen nach Induktion der Autophagie durch Hungern wie erwartet zu, blieb jedoch bei den *Fyco1*-Knockout Mäusen aus. Ein vergleichbares Ergebnis erzielte die Nachlasterhöhung mit daraus folgender linksventrikulärer Hypertrophie nach TAC. Die *Fyco1*-KO Mäuse zeigten ein vermindertes Fractional Shortening im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass *Fyco1* bei der Regulation der kardialen Autophagie eine wichtige Rolle spielt und das Ausbleiben dieser zu einer verschlechterten Herzfunktion geführt haben könnte (Kuhn et al. 2012).

Die ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe erzielten *in-vitro*-Versuche zeigen die Überexpression von FYCO1 durch Infektion neonataler Ventrikelkardiomyozyten aus Ratten (neonatal rat ventricular cardiomyocytes, NRVCN) mit einem entsprechenden Adenovirus (AdFYCO1). Diese geht unter Basisbedingungen mit einem signifikant erhöhten Autophagie-Niveau, gemessen als normalisiertes LC3-II zu Tubulin, einher. Bei Glukoseentzug wird die Autophagie bei *Fyco1*-Überexpression stärker induziert als in den AdlacZ-infizierten NRVCN (s. Abbildung 1-8, A+B). Immunzytologische Färbungen zeigen im Vergleich zu den AdlacZ-infizierten NRVCN bei FYCO1-Überexpression eine vermehrte Anreicherung von Autophagosomen (GFP-LC3). Diese Autophagosomen zeigen eine Co-Lokalisation mit FYCO1 (FYCO1 + GFP-LC3). Die Sarkomerstruktur ist unverändert (α -Actinin + GFP-LC3) (s. Abbildung 1-8, C).

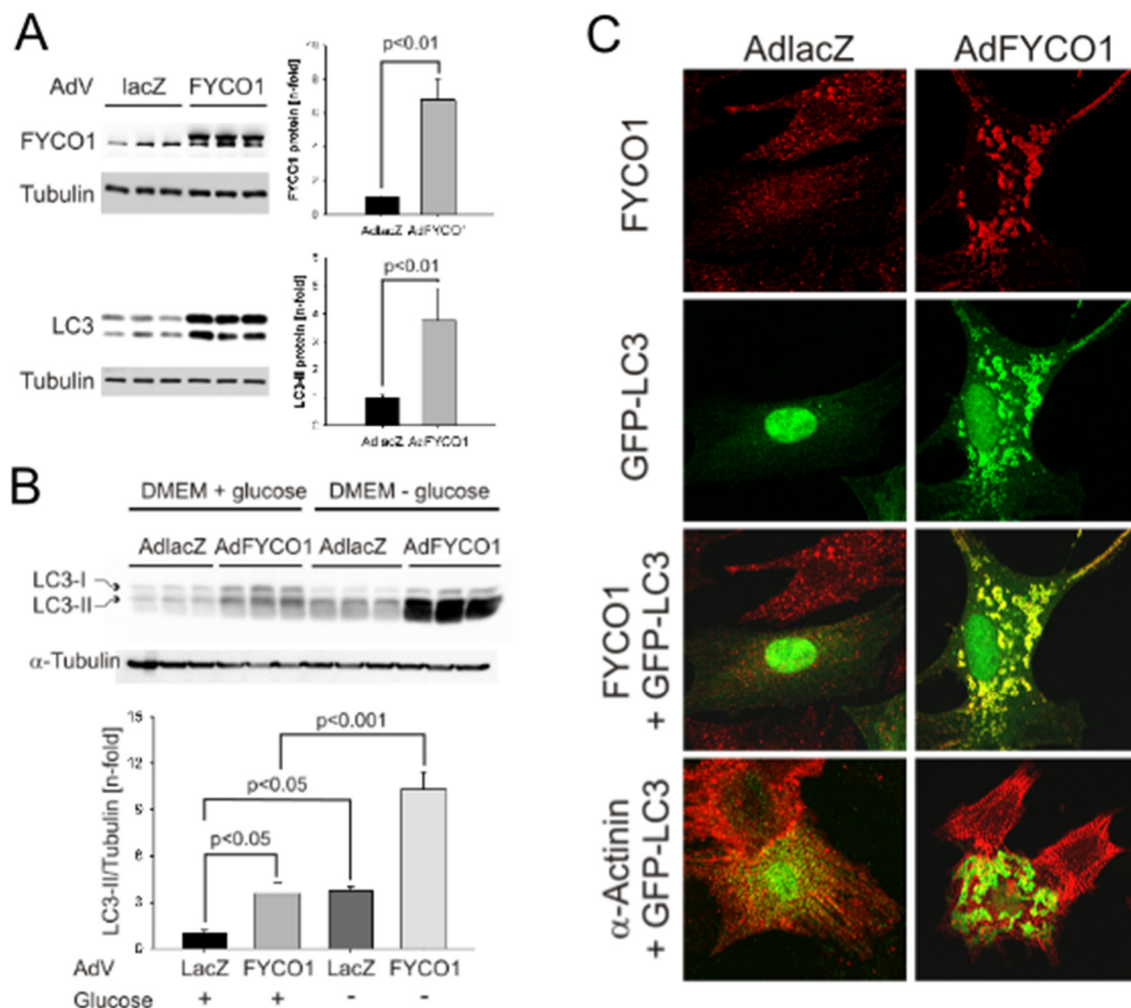


Abbildung 1-8: In vitro Überexpression von FYCO1 in NRVCs (Kuhn et al. 2014).

A. AdlacZ und AdFYCO1 infizierte NRVCs zeigen eine signifikante Überexpression von FYCO1 und LC3-II, jeweils normalisiert auf Tubulin. **B.** Durch Glukoseentzug wird die Autophagie induziert (siehe AdlacZ, ± Glukose). Diese Induktion ist in den AdFyc1 infizierten NRVCs hochsignifikant verstärkt (siehe AdFYCO1, ± Glukose). **C.** Immunzytologische Färbungen der AdlacZ und AdFYCO1 infizierten NRVCs zeigen eine deutliche Anreicherung von Autophagosomen in den FYCO1-überexprimierten Zellen (GFP-LC3). Diese sind von perinukleär nach peripher transloziert und mit FYCO1 co-lokalisiert, ohne eine veränderte Sarkomerstruktur aufzuweisen (α-Actinin).

Interessant sind dazu die *in vitro*-Daten zur Messung des autophagischen Flux, um zwischen einer erhöhten Induktion oder einem verminderten Abbau der Autophagosomen diskriminieren zu können. Dazu wurden NRVCs mit einem AdFYCO1 oder AdLacZ infiziert und anschließend für vier Stunden mit Bafilomycin A1 inkubiert. Bafilomycin A1 inhibiert die Autophagie, indem es die H⁺-ATPase der Vakuolen (V-ATPase) hemmt und die Autophagosomen nicht mit einem Lysosom zur Degradation fusionieren können (Yamamoto et al. 1998). Ein weiterer Anstieg von LC3-II nach Applikation von Bafilomycin A1 spricht für eine gesteigerte Autophagie-Induktion, während gleichbleibende LC3-Spiegel für eine Hemmung im Abbau der

Autophagosomen sprechen. *In vitro* zeigt sich die Bafilomycin A1 Wirkung durch einen Anstieg des LC3-II-Levels der AdLacZ infizierten NRCM ($p < 0,001$). Durch die Überexpression von FYCO1 mittels AdFYCO1 wird die Autophagie ebenfalls gesteigert ($p < 0,01$). Nach Bafilomycin A1 Inkubation steigt das LC3-II-Level der AdFYCO1 infizierten Zellen sogar weiter an ($p < 0,01$) (s. Abbildung 1-9). Das bedeutet, dass FYCO1 die Autophagie induziert, statt den Abbau der Autophagosomen zu inhibieren.

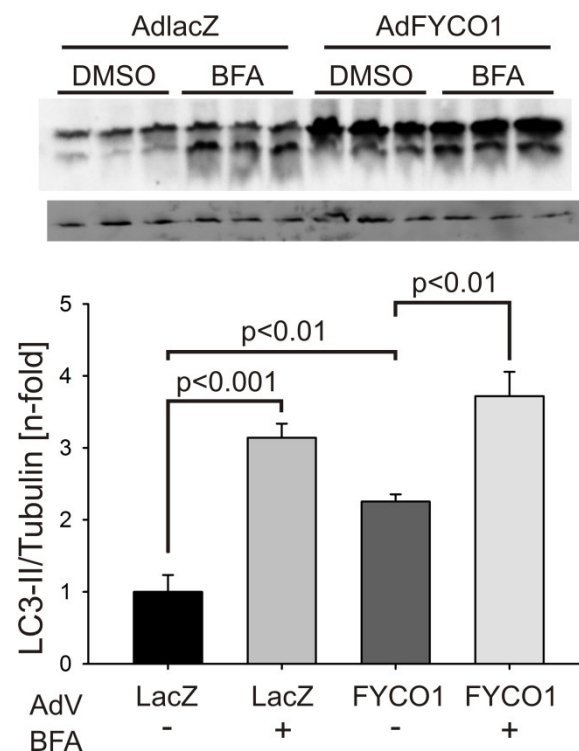


Abbildung 1-9: Messung des autophagischen Flux mittels Bafilomycin A1 *in vitro* (Kuhn et al. 2014).

NRCM (neonatal rat cardiomyocytes) wurden für 4 Stunden mit Bafilomycin A1 behandelt. Die β -Galaktosidase-überexprimierenden Zellen (AdLacZ) zeigten anschließend einen Anstieg der Autophagie-Aktivität ($p < 0,001$). Durch die Überexpression von FYCO1 in den unbehandelten Zellen wurde die Autophagie-Aktivität gesteigert ($p < 0,01$). Bafilomycin A1 bewirkte in diesen Fyco1-überexprimierenden Zellen sogar einen 65%igen Anstieg des LC3-II-Levels verglichen mit den unbehandelten AdFYCO1-NRCM ($p < 0,01$).

Aus diesen Ergebnissen leiten wir die Vermutung ab, dass durch eine Fyco1-Überexpression *in vivo* eine erhöhte Autophagie-Aktivität zu erwarten ist, die einen protektiven Effekt bei der Entwicklung einer kompensatorischen Hypertrophie nach TAC aufweisen kann, sodass trotz Nachlastserhöhung eine verbesserte Herzfunktion in den Fyco1-transgenen Tieren resultiert.

In einem ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Versuch wurden mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System mögliche Bindungspartner von FYCO1 identifiziert. Auffällig ist, dass eine Vielzahl von Sarkomerproteinen als Interaktionspartner von FYCO1 infrage kommen. Diese Strukturproteine sind beim kardialen Remodeling von wichtiger Bedeutung und deren Abbau könnte durch FYCO1 beeinflusst werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist zum einen die Klonierung und Etablierung eines transgenen Mausmodells (C57BL/6NCrl/-Tg(Myh6-Fyco1)1Uhg), welches Fyco1 herzspezifisch überexprimiert sowie dessen histologische und echokardiographische Basischarakterisierung. Die herzspezifische Expression erfolgt unter Kontrolle eines α MHC-Promoters (alpha-myosin heavy chain-Promoter).

In den *Fyco1*-Knockout Mäusen konnte eine schlechtere Herzfunktion nach TAC durch ausbleibende Autophagie-Induktion gezeigt werden. Daher soll diese Arbeit der Frage nachgehen, ob die herzspezifische Überexpression von Fyco1 sich in Belastungssituationen protektiv im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren auswirkt. Dies würde sich histologisch durch eine verminderte Hypertrophie und echokardiographisch durch eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion zeigen. Als weitere Kontrolle werden scheinoperierte (Sham) Tiere verwendet. Diese Tiere werden im Hintergrund eines weiteren transgenen Mausmodells gezüchtet (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP/Map1lc3b)53Nmz) (Mizushima et al. 2004). Dadurch kann das Niveau der Autophagie histologisch gemessen werden, indem die LC3-II-gekoppelten Autophagosomen in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht und quantifiziert werden können.

Abschließend soll der Frage nachgegangen werden, in welche Signalwege FYCO1 eingebunden ist. Dazu werden *in vitro* Versuche gemacht, die neue Interaktionen von FYCO1 mittels Co-Immunopräzipitation bestätigen sollen. Bei Interaktionen von FYCO1 zu Sarkomerproteinen der Kardiomyozyten liegt die Vermutung nahe, dass es zur Regulation kardialer Hypertrophie entscheidend beitragen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare
Axiovert 40 C Mikroskop	Carl Zeiss
Cell Scraper 16 cm 2-position blade	Sarstedt
Cellstar Zellkulturplatten 6-, 12-, 24-Well	Greiner Bio One
Centrifuge 5810	Eppendorf
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories
Deckgläser, 24x60 mm	Marienfeld
Duomax 1030 Plattformschüttler	Heidolph
DynaMag-2 Magnetic Particle Conc.	Invitrogen
ECX-F26.M UV-Transilluminator	Peqlab Biotechnologie
Elektroporationsküvette	Peqlab Biotechnologie
Faltenfilter 110 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
FluorChem™ Q Kamera (Western Blot)	Alpha Innotech
FluorPreserve™ Reagent	EMD MILLIPORE
Galaxy Ministar Mikrozentrifuge	VWR
Heraeus Fresco 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Pico 21 Zentrifuge	Thermo Scientific
Infinite® M200Pro Mikroplattenleser	Tecan
MicroPulser electroporator	Bio-Rad Laboratories
Mikrotiterplatten 96-Well	Nunc
Mikroskop BZ-9000	Keyence
Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories
Multiply-µStrip 8er Kette Gefäße	Sarstedt
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories
NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld
Pasteurpipetten ohne Stopfen	Carl Roth
Petrischale 35 x 10 mm	Sarstedt
Pipette Eppendorf-Reference	Eppendorf Research
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Sarstedt
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Power Pac™ HC	Bio-Rad Laboratories
Power Pac™ P25 Stromversorgung	Biometra
PP-Mikroplatte 96-Well	Greiner Bio One
Precellys® 24	Peqlab Biotechnologie
RCT Basic Magnetrührer	IKA
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Röhrchen, luftdurchlässig, 14 ml	Sarstedt
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Scanlaf Titan Hood	Fisher Scientific

Serologische Pipetten
 SevenEasy™ pH-Messgerät
 Steril-Cult™ 200 Inkubator
 SterilGARD® Hood
 Sub-Cell® GT/ 192/ Wide Mini
 TE1502S Präzisionswaage
 Thermomixer® Comfort
 Titan PCR-Arbeitsstation
 Titramax 100 Plattfomschüttler
 Vacusafe Absaugsystem
 Variomag Poly Magnetrührer
 Vevo 1100 imaging system
 Vivid 7 system
 Vortex-Genie® 2

Sarstedt
 Mettler-Toledo
 Labotect
 Baker Company
 BioRad
 Sartorius
 Eppendorf
 Scanlaf
 Heidolph
 Integra Biosciences
 Thermo Scientific
 VisualSonics
 GE Healthcare
 Scientific Industries

2.1.2 Chemikalien

Agarose
 Albumin Fraktion V (aus Rinderserum)
 Carbenicillin
 DAPI
 DEPC
 DMEM
 DMSO
 DNA Loading Dye 6x
 DreamTaq 10x Puffer grün
 EDTA
 Elution Buffer
 Ethanol
 Ethidiumbromid
 FCS (Fetal Calf Serum)
 GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder
 iQ™ Multiplex Powermix
 Kanamycin
 Lipofectamin® 2000 Reagent
 Lectin from *T. vulgaris*, FITC conjugate (L4895)
 Methanol
 Natriumchlorid
 Natriumhydroxid
 PageRuler™ Plus Protein Ladder
 Penicillin/Streptomycin
 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
 Protein-Assay Farbstoff-Konzentrat
 QIAzol Lysis Reagent
 Quick Extrakt DNA Solution 1.0
 Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)
 SDS
 Spectinomycin
 TEMED 99 % p.a. Elektrophorese

Biozym Scientific GmbH
 Merck Millipore
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 Sigma-Aldrich
 PAA Laboratories
 Sigma-Aldrich
 Fermentas
 Thermo Scientific
 Serva Electrophoresis
 Qiagen
 Carl Roth
 Invitrogen
 PAA Laboratories
 Fermentas
 Bio-Rad Laboratories
 Sigma-Aldrich
 Invitrogen
 Sigma-Aldrich
 Carl Roth
 AppliChem
 AppliChem
 Thermo Scientific
 Invitrogen/Gibco
 Carl Roth
 Bio-Rad Laboratories
 Qiagen
 Biozym
 Carl Roth
 Serva Electrophoresis
 Sigma-Aldrich
 Carl Roth

Tris-HCl
 Triton™ X
 Tween® 20
 Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 647 Conjugate
 Yeast-Extract

Carl Roth
 Serva Electrophoresis
 Sigma-Aldrich
 Thermo Scientific
 BD Biosciences

2.1.3 Enzyme

Complete™ Proteinase Inhibitor Cocktail
 Desoxyribonuclease I (DNase I)
 DreamTaq DNA-Polymerase
 Hind III
 LR-Clonase™ II
 Not I-HF™
 Pfu-Polymerase
 Phosphatase-Inhibitor 2 und 3
 Proteinase K
 RNaseOUT™
 Sall
 T4-DNA-Ligase
 Trypsin/EDTA-Lösung

Roche Diagnostics
 Thermo Scientific
 Thermo Scientific
 Thermo Scientific
 Invitrogen
 New England Biolabs
 Thermo Scientific
 Sigma-Aldrich
 Invitrogen
 Invitrogen
 Thermo Scientific
 New England Biolabs
 Invitrogen/Gibco

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
anti- α -Actinin	Maus	Sigma-Aldrich
anti- α -Tubulin	Maus	Sigma
anti-Atg5	Kaninchen	Cell Signaling via NEB
anti-Beclin1	Kaninchen	Cell Signaling via NEB
anti-c-myc	Kaninchen	Santa Cruz
anit-Fyco1	Kaninchen	Novus Biologicals
anti-HA	Maus	Sigma
anti-LC3	Kaninchen	Cell Signaling via NEB
anti-MYH7	Maus	Sigma
anit-p62	Kaninchen	Origene
anti-Rab7	Kaninchen	Sigma

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Antikörper-Bezeichnung	Spezies	Hersteller
anti-Kaninchen-HRP	Esel	Santa Cruz
anti-Maus-Alexa Fluor 546	Esel	Life Technologies
anti-Maus-HRP	Ziege	Santa Cruz

2.1.5 Kits

ECL-Detektionssystem
 NucleoSpin® Plasmid Kit
 Qiagen® Plasmid Midi Kit
 QIAquick® Gel Extraction Kit
 Superscript® III First Strand Kit

GE Healthcare
 Macherey-Nagel
 Qiagen
 Qiagen
 Invitrogen

2.1.6 Oligonukleotide

2.1.6.1 Primer zur Klonierung

Primer	Sequenz
hFYCO1_Sall_f	5'-ATA GTC GAC CAC CAT GGC CTC CAC CAA TGC AGA GAG CC-3'
hFYCO1_Sall_r	5'-ATA GTC GAC CTA CAG GAA ATC ACT TCC ATC GTA GAT CAC AGG C-3'

2.1.6.2 Primer zur Sequenzierung

Primer	Sequenz
FYCO1seq_847r	5'-GTC TGC AGG TAG CTG CTC ACC AA-3'
FYCO1seq_1658r	5'-GCT CGT GTG GGC CAG CAA CT-3'
FYCO1seq_2266r	5'-ACA GCC AGC AAG CTC GCC TC-3'
FYCO1seq_2882r	5'-CAG CTG TGC TTCC TCG GAG CTG-3'
FYCO1seq_3436r	5'-ATG GCC GCCT GGCA CTC TGC-3'
FYCO1seq_4044r	5'-CGT CCG GTG GCC TGT AGT CTG-3'
hGH1pA/GT_R	5'-CAA CTT CCA GGG CCA GGA GAG G-3'

2.1.6.3 Primer zur Genotypisierung

Primer	Sequenz
hGH5'_revers	5'-CAC TCC AGC TTG GTT CCC AAT AGA CCC-3'
hGH1pA/GT_R	5'-CAA CTT CCA GGG CCA GGA GAG G-3'
FYCO1 forward (4020)	5'-AAT ACA GAC TAC AGG CCA CCG GAC G-3'
hFYCO1seq_4577f	5'-GCT CAT CTT CGA CAA TAC CTT CTC AAG G-3'
Autoph_1	5'-ATA ACT TGC TGG CCT TTC CAC T-3'
Autoph_2	5'-CGG GCC ATT TAC CGT AAG TTA T-3'
Autoph_3	5'-GCA GCT CAT TGC TGT TCC TCA A-3'
Rpl32_165_f	5'-GGT GGC TGC CAT CTG TTT TAC-3'
Rpl32_165_r	5'-CCG CAC CCT GTT GTC AAT GC-3'

2.1.6.4 Primer zur qRT-PCR

Primer	Sequenz
Nppa_F	5'-GGAGCAAATCCTGTGTACAGTG-3'
Nppa_R	5'-ACCTCATCTTCTACCGGCAT-3'
Nppa_PRB	5'-FAM-TGATGGATTTC AAGAACCTGCTAGACCA-BHQ1-3'
Nppb_F	5'-ACAAGATAGACCGGATCGGA-3'
Nppb_R	5'-AGCCAGGAGGTCTTCCTACA-3'
Nppb_PRB	5'-HEX-TCAGTGC GTTACAGCCCAAACGA-BHQ1-3'
Rcan1_F	5'-TAGCTCCCTGATTGCTTGTG-3'
Rcan1_R	5'-GGATTCAAATTTGGCCCTGG-3'
Rcan1_PRB	5'-Cy5-ACGATGATGTCTTCAGCGAAAGTGAGAC-BHQ2-3'
Rpl32_F	5'-CTGCTGATGTGCAACAAATCT-3'
Rpl32_R	5'-GCTGTGCTGCTCTTTCTACAAT-3'
Rpl32_PRB	5'-Texas Red-ACTGTGCTGAGATTGCTCACAATGTGT-BHQ2-3'

2.1.7 Vektoren und Plasmide

Vektor	Verwendung
pBS SKII+ aMHC FLAG hGH1	Klonierungsvektor
pcDNA 3.1_NT-HA	Leervektor
pcDNA 3.1_NT-myc	Leervektor
pcDNA 3.1_Fyco1-HA	Expressionskonstrukt
pcDNA 3.1_MYH7-myc	Expressionskonstrukt
pDON221_MYH7-WT mit Stop	Entry-Klon

2.1.8 Puffer und Lösungen

Kern Lyse Puffer (KLP) für Proteinextraktion

20 mM	Tris pH 8
12,5 % (v/v)	Glycerol
10 mM	DTT
1 % (v/v)	NP-40
500 mM	NaCl

zu 1 ml Kern Lyse Puffer wurden kurz vor Verwendung folgende Enzyme hinzugegeben:

40 µl	25 x Proteinase-Inhibitor-Cocktail
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 2
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 3

Ladepuffer für DNA (sechsfach konzentriert)

15 % (w/v)	Ficoll 400, type 400
0,005 % (w/v)	Bromphenolblau
0,005 % (w/v)	Xylen

Laufpuffer für SDS-PAGE (zehnfach konzentriert)

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS

Lysepuffer für Proteinextraktion bei der Co-IP

20 mM	Tris pH 8
500 mM	NaCl
12,5 % (v/v)	Glycerol

zu 1 ml wurden kurz vor Verwendung folgende Enzyme hinzugegeben:

40 µl	25 x Proteinase-Inhibitor-Cocktail
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 2
10 µl	Phosphatase-Inhibitor 3

PBS (einfach konzentrierte Gebrauchslösung)

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
4,3 mM	Na ₂ HPO ₄
1,47 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, autoklaviert

Proben-Puffer nach Laemmli (vierfach konzentriert)

250 mM	Tris pH 6,8
5 % (w/v)	SDS
40 % (v/v)	Glycerin
0,005 % (w/v)	Bromphenolblau
10 % (v/v)	2-Mercaptoethanol

Ripa-Puffer zum Waschen bei der Co-IP

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 % (v/v)	NP-40
0,5 % (w/v)	Na-Desoxycholat
0,2 % (w/v)	SDS

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

0,5 M	Tris-Cl, pH 6,8
-------	-----------------

TAE-Puffer (50-fach konzentriert)

3 M	Tris-Acetat
0,05 M	EDTA, pH 8,3

TBS-Lösung

100 mM	Tris-Cl, pH 7,5
0,9 % (w/v)	NaCl

Transferpuffer für Western-Blot

20 % (v/v)	Methanol
25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,037 % (w/v)	SDS

Trenngelpuffer für SDS-PAGE

1,5 M	Tris, pH 8,8
-------	--------------

2.1.9 Medien

Medium zur Bakterienkultur: 2 YT-Medium

Für einen Liter werden folgende Mengen angesetzt:

10 g	Trypton
10 g	Yeast Extrakt
5 g	NaCl

Medium zur Bakterienkultur: LB-Flüssigkeitsmedium

Für einen Liter werden folgende Mengen angesetzt:

1 % (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl
pH 7.0	mit NaOH

Medium zur Bakterienkultur: LB-Festmedium

Für einen Liter werden folgende Mengen angesetzt:

1 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl
1,5 % (w/v)	Agar
pH 7.0	mit NaOH

Medium zur Kultivierung von Säugetierzellen

Medien für die Zellkultur wurden bei 4 °C gelagert und kurz vor dem Einsatz in der Zellkultur in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Medium zur Kultur von HEK-293A Zellen

DMEM Advanced (Fertigmedium) inklusive:

4,5 g/l	Glukose
110 mg/l	Natriumpyruvat

Ggf. Zusatz von:

4 % (w/v)	FCS
100 U/l	Penicillin G
100 µg/ml	Streptomycin
2 mM	L-Glutamin

2.1.10 Zelllinien

Die HEK-293 Zelllinie ist eine humane, embryonale Nierenzelllinie (human embryonic kidney Cell Line), die mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus Typ 5 transformiert wurde und zur Vermehrung rekombinanter Adenoviren sowie zur Proteinexpression genutzt wird (Graham et al. 1977). In unserem Labor wurde der Subklon HEK-293A verwendet, dessen flache Morphologie zur besseren Übertragung adenoviraler Konstrukte geeignet ist und außerdem

eine stabil integrierte Kopie des E1-Gens enthält. Letztere kodiert für die E1-Proteine, die wiederum für die Erzeugung rekombinanter Adenoviren erforderlich sind. Zur Kultivierung wurde das Advanced DMEM Medium plus 4% (w/v) fetalem Kälberserum (FCS) verwendet.

2.1.11 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse (*Mus musculus*) im Hintergrund der Linie C57BL/6NCrl genutzt. Die transgenen Mauslinien wurden am IBF/ Biotechnologie Labor der Universität Heidelberg mittels Mikroinjektion generiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

2.2.1.1 Herstellung von elektrokompenten Bakterien

Die Anzucht des *Escherichia coli* (*E. coli*) Stammes DH10B von Invitrogen erfolgte im Luria-Bertani (LB) Flüssigmedium. Dazu wurden zunächst 50 ml LB-Medium mit den DH10B Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Nach 24 Stunden wurden 10 ml der Bakteriensuspension in 1 Liter 2 YT-Medium überführt (optische Dichte der Suspension gemessen bei 600 nm Wellenlänge $OD_{600nm} = 0,1$) und im Brutschrank so lange angezüchtet, bis eine OD_{600nm} von 0,4-0,8 erreicht wurde. Diese wurde in einen Zentrifugenbecher umgefüllt und nach zehnminütiger Inkubation auf Eis für 15 min bei 4.000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit eiskaltem ddH₂O sowie einmaligem Waschen mit 10%igem Glycerin (mit jeweils zwischenzeitigem Zentrifugieren), wurden die Bakterien in 1,5 ml 10%igem Glycerin aufgenommen und à 50 µl in PCR-Tubes aliquotiert. Nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Langzeitlagerung bei -80 °C.

2.2.1.2 Transformation elektrokompenter Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation

Zur Transformation von Plasmid-DNA in die elektrokompenten DH10B Bakterien aus Kapitel 2.2.1.1, wurden ca. 10 ng DNA (1-3 µl) zu 50 µl der aufgetauten Bakteriensuspension vorsichtig hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren vermengt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporations-Küvette in den 1 mm breiten Spalt zwischen den Kontaktplatten gegeben. Anschließend wurde die Küvette in den Elektroporator „MicroPulser electroporator“ von Bio-Rad gestellt. Der Kondensator des Elektroporators wurde im Programm „Ec1“ mit einer Spannung von 1,8 kV geladen und anschließend in einem Puls über die Küvette entladen. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien mit 1.000 µl

LB-Medium aus der Küvette aufgenommen und bei 37  C für eine Stunde im Thermomixer bei 300 rpm geschüttelt. Danach wurden zwischen 50-500 Öl der Ansätze auf entsprechenden selektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37  C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten die gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und für eine Kolonie-PCR genutzt und/ oder als Flüssigkultur in LB-Medium hochgezogen werden.

2.2.1.3 Anzucht von Bakterien auf Selektivnährböden

Die Selektivnährböden wurden wie folgt hergestellt: Zum LB-Flüssigmedium wurde 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt, autoklaviert und anschließend die entsprechende Menge des gewünschten Antibiotikums hinzugegeben (s. Tabelle 2.1). Mit diesem Ansatz wurden Petrischalen unter einer Sterilbank mit dem gewünschten Volumen bef llt und für 30 min bei RT ausgehärtet, um langfristig bei 4  C gelagert zu werden.

Tabelle 2.1: Verwendete Konzentration der Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration [�g/ml]
Carbenicillin	100
Spectinomycin	50
Kanamycin	50

Wenn Bakterien auf einem entsprechenden Selektivnährboden angezüchtet wurden, konnten sie entweder mit einer vorher abgeflammt n  se ausgestrichen oder eine entsprechende Menge der Bakteriensuspension mit autoklavierten Glaskugeln durch Schütteln der Platte verteilt werden.

2.2.1.4 Anzucht von Bakterien in Selektivmedium

Um Bakterien in einer Flüssigkultur anzüchten zu können, wurde das LB-Flüssigmedium mit dem Antibiotikum angesetzt, für das eine Resistenz in der Plasmid-DNA vorlag (Konzentration s. Tabelle 2.1). Diese wurde entweder mit einer Bakteriensuspension oder einem einzelnen Bakterienklon, welcher mit einer Pipettenspitze aufgenommen wurde, beimpft und über Nacht bei 37  C und 200 rpm im Brutschrank geschüttelt.

Zur längeren Aufbewahrung konnten die Bakterien als „Glystock“ bei -80  C gelagert werden. Dazu wurden 2 ml der Übernachtkultur bei 11.000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zunächst mit 100 Öl der Stocklösung resuspendiert und anschließend ad 1.000 Öl mit der Stocklösung aufgefüllt. Die Stocklösung besteht aus 60%igem Glycerol und dem LB-Flüssigmedium, welche im Verhältnis von 1:1 miteinander gemischt wurden.

2.2.2 Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Kultur von HEK 293-A Zellen

Kulturbedingungen

Zur Kultivierung der HEK 293-A Zellen wurden Flaschen mit 175 cm² Grundfläche, Multiwell-Platten mit 6 Wells sowie 10-cm-Schalen benutzt. Diese wurden in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wachsen dabei adhärent in einer singulären Schicht (monolayer) auf dem Boden des Kulturgefäßes. Wurden Zellen bearbeitet, so geschah dies unter einer Sterilbank.

Auftauen, Passagieren und Kryokonservieren der Zellen

Zum Auftauen wurde das Kryokonservierungsgefäß mit den gefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert, bis die Zellen aufgetaut waren. Anschließend wurde das Konservierungsgefäß aus dem Wasserbad entnommen, mit 70-prozentigem Ethanol gereinigt und die Zellen unter der Sterilbank tropfenweise in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, mit 10 ml Kulturmedium befüllt und für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen war, wurden 6 ml Kulturmedium hinzugegeben und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in geeigneten Kulturgefäßen ausgesät.

Wenn die Zellen eine Konfluenz etwa 70-80 % erreichten, wurden sie auf neue Kulturgefäße geteilt. Zunächst wurde das Medium vorsichtig abgenommen und anschließend mit sterilem, 37 °C warmen PBS gewaschen. Dann wurde eine vorgewärmte einfach konzentrierte Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben und so lange mit den Zellen bei 37 °C inkubiert, bis sich diese von der Unterfläche gelöst hatten. Um die Enzymbehandlung zu stoppen, wurde FCS-haltiges Medium hinzugegeben und die Zellsuspension anschließend in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm wurde der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und in geeignete Kulturgefäße ausgesät (s. Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Zellzahl bei der Aussaat der HEK 293-A Zellen zur Protein-Isolierung.

Zellkulturformat	Oberfläche [mm ²]	Zellzahl	Kulturmedium [ml]
6-Well-Platte	10	3 x 10 ⁵ /Well	2
10cm-Schale	60	2 x 10 ⁶ /Schale	15

Erreichten die Zellen ein Konfluenz von etwa 80 %, wurden sie zur Kryokonservierung mittels der erwärmten, einfach konzentrierten Trypsin-EDTA-Lösung von der Unterfläche gelöst und anschließend sedimentiert (s.o). 9 ml FCS und 1 ml DMSO wurden vermengt, anschließend filtriert, das Zell-Pellet mit dieser Lösung resuspendiert und auf Kryokonservierungsgefäße

verteilt. Die Lagerung erfolgt zunächst in einer Isopropanol-Box bei -80 °C und langfristig in flüssigem Stickstoff.

2.2.2.2 Transfektion von HEK 293-A Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA [µg] in HEK 293-A Zellen wurde Lipofectamine™ 2000 [µl] benutzt. Die Zellen wurden in einem antibiotikafreien Medium (DMEM Advanced + L-Glutamin, + 4 % FCS) ausgesät und waren vor der Transfektion etwa 80 % konfluent. Für die Expressionsnachweise wurde in 6-Well-Platten und bei der Co-IP in 10-cm-Schalen transfiziert. Die entsprechenden Mengen sind in der Tabelle 2.3 angegeben. Lipofectamine™ 2000 wurde zur entsprechenden Menge antibiotikafreiem Medium hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In dieser Zeit wurde die Plasmid-DNA in einem zweiten Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Menge Medium vermengt. Anschließend wurden die Ansätze für DNA und Lipofectamine™ gemischt und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Die DNA-Lipofectamine™-Komplexe wurden tropfenweise in die Wells bzw. Schale gegeben. Nach 24 Stunden wurde auf selektives antibiotikahaltiges Kulturmedium gewechselt (DMEM Advanced + L-Glutamin, + 4 % FCS, + Penicillin, + Streptomycin). Nach 48 Stunden wurden die transfizierten Zellen geerntet und das Protein aufgereinigt.

Tabelle 2.3: Transfektionsschema mit Lipofectamine™ 2000 in HEK 293-A Zellen.

Zellkulturformat	Plasmid-DNA [µg]	Lipofectamine™ [µl]	Medium [µl]
6-Well-Platte	4/Well	5	2 x 250
10cm-Schale	24 bzw. 2 x 12	30	2 x 1.500

2.2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - DNA

2.2.3.1 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmid-Mini-Präparation über Säulen

Bei der Plasmid-Mini-Präparation wurde nach dem Nucleo Spin® Plasmid Kit Protokoll für Plasmide mit geringer Plasmidkopienzahl (low-copy plasmids) nach Angaben des Herstellers Macherey-Nagel verfahren. Eine 5 ml LB-Flüssigkultur des transfizierten Bakteriums wurde über Nacht unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums inkubiert und bei 11.000 g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 500 µl A1-Puffer, welcher mit RNase versetzt wurde, resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl A2-Puffer zur alkalischen Lyse hinzugegeben, kurz geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Das Zugabe von 600 µl A3-Puffer neutralisierte den Ansatz durch kurzes Schütteln und wurde anschließend bei 11.000 g für 5 min zentrifugiert. Zur weiteren Aufreinigung wurden die

Silikamembran-Säulen verwendet. Der klare Überstand wurde in 750 µl Schritten auf die Membran pipettiert und anschließend 1 min bei 11.000 g zentrifugiert, wobei die DNA in der Membran verblieb und der Durchfluss verworfen werden konnte. Anschließend wurden 500 µl AW-Waschpuffer auf die Säulen gegeben, 1 min bei 11.000 g abzentrifugiert, 600 µl A4-Ethanolpuffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. So wurde die Membran auch von Zell- und Proteinresten gereinigt, sodass einzig die Plasmid-DNA zurückgehalten wurde. Zum Trocknen wurde die Säule für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert und nach Hinzugeben von 50 µl AE-Puffer für 1 min bei RT inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren bei 11.000 g für 1 min konnte die DNA in ein Reaktionsgefäß eluiert und zur Konzentrationsbestimmung mittels Spektrophotometrie (NanoDrop® 2000, Peqlab Biotechnologie) verwendet werden.

Plasmid-Midi/Maxi-Präparation über Säulen

Bei der Plasmid-Midi- bzw. Plasmid-Maxi-Präparation wurde nach dem Plasmid Plus Midi Kit und dem Plasmid Plus Maxi Kit Standardprotokoll für Plasmide mit geringer Plasmidkopienzahl (low-copy plasmids) nach Angaben des Herstellers Qiagen verfahren. Eine LB-Flüssigkultur des transfizierten Bakteriums wurde über Nacht unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums inkubiert und bei 4.500 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit P1-Puffer, welcher mit RNase versetzt wurde, resuspendiert. Nach Zugabe von P2-Puffer wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt und für 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde gekühlter P3-Puffer hinzugegeben, wieder vorsichtig geschwenkt und der Ansatz für 15-20 min auf Eis neutralisiert. Um die DNA von den Zellresten zu reinigen, wurde das Lysat bei 4 °C für 30 min bei 14.500 rpm in einem Carbonrotator zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf vorher mit QBT-Puffer equilibrierte Qiagen-tip Silikamembran-Säulen gegeben und tropfte durch die Membran in das Kollektorgefäß. Die Plasmid-DNA wurde von der Silikamembran zurückgehalten, welche anschließend zweimalig mit dem QC-Waschpuffer gewaschen wurde. Die Plasmid-DNA wurde mittels 65 °C warmen QF-Puffer eluiert, mit Isopropanol gefällt und von 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in einer adäquaten Menge 10 mM Tris-Cl (pH 8,5) aufgenommen und die Konzentration im Spektrophotometer bestimmt.

2.2.3.2 Extraktion von DNA aus Mausschwanzspitzen-Biopsien

Zur DNA Extraktion aus Mausschwanzspitzen-Biopsien (Tail) wurde die Quick Extrakt DNA Solution 1.0 von Biozym verwendet. Zu jedem Tail wurden 25 µl der Quick Extrakt DNA Solution hinzugegeben, 15 sek gevortext und anschließend bei 65 °C und 750 rpm für 30 min im Thermomixer geschüttelt. Danach wurden die Tails nochmals für 15 s gevortext und

anschließend bei 98 °C für 5 min im Thermomixer inkubiert. Nun konnte die Probe für eine Genotypisierungs-PCR genutzt werden.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung verschiedener Moleküle nach Größe und ihrer elektrischen Ladung, indem sie in einem konstanten Spannungsfeld unterschiedlich schnell horizontal durch ein Gel hindurchwandern. Werden die Moleküle anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht, erkennt man ein für die Probe typisches Bandenmuster anhand derer eine Zuordnung möglich ist. Am häufigsten wurde sie für DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau oder DNA-Abschnitte nach PCR verwendet. Zunächst wurde Agarose [g] in 1 x TAE-Puffer [ml] im gewünschten Verhältnis (0,8-2 %) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Diese wurde auf einem Gelschlitten verteilt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versehen, bevor die Kämme für die Probenaschen eingebracht wurden. Nach der Polymerisation des Agarosegels wurde es in die Kammer, die mit 1 x TAE-Puffer gefüllt war und das Gel vollständig umhüllte, eingebracht und die DNA-Proben inklusive eines DNA-Probenpuffers in die Taschen aufgetragen. Zur späteren Identifikation der DNA-Größen wurde ein Marker (häufig der Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder) mit aufgetragen. Je nach Größe des Gels wurde eine konstante Spannung von 80-140 V angelegt, die die Proben von der Kathode zur Anode wandern ließ. Sobald diese genügend aufgetrennt waren, konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und gegebenenfalls extrahiert werden.

2.2.3.4 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Zum Aufreinigen von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit verwendet. Die entsprechende DNA-Bande wurde aus dem Gel geschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen [1 mg ~ 1 µl]. Das dreifache Volumen des Gels wurde als QG-Puffer [µl] hinzugegeben und bei 50 °C für 10 min bei 600 rpm im Thermomixer geschüttelt bis das Gel vollständig aufgelöst war. Die Lösung wurde in 750 µl Schritten auf eine sterile QIAquick Silikamembran-Säule pipettiert und anschließend 1 min bei 17.000 g zentrifugiert, wobei die DNA in der Membran verblieb und der Durchfluss verworfen werden konnte. Anschließend wurden 500 µl QG-Puffer auf die Membran gegeben, ebenfalls zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde zweimal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und zwischendurch zentrifugiert. Um die Membran zu trocknen wurde sie am Schluss für 3 min bei 17.000 g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit 22 µl EB-Puffer wurde die DNA schließlich für 1 min bei RT inkubiert und durch Zentrifugation eluiert. Die DNA-Konzentration konnte mittels Spektrophotometer bestimmt werden. Zur

Sequenzierung wurde die Probe mit den entsprechenden Primern (s. Kapitel 2.1.6.2) an die Firma Eurofins Genomics versandt.

2.2.3.5 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Abschnitte vervielfachen zu können, wird die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Dabei hybridisieren zwei gegenläufige PCR-Primer je DNA-Abschnitt an der Template-DNA und werden von einer hitzestabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase am 3'-Ende komplementär zum Template verlängert. So entstehen kleine Abschnitte doppelsträngiger DNA, deren Länge vom Bindungsort der zwei gegenläufigen Primer abhängt. Durch zyklische Wiederholungen von Denaturierung, Annealing und Elongation wird der DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt (bei n Zyklen entstehen 2^n DNA-Stränge).

Jede PCR benötigt folgende Komponenten: eine Template-DNA, gegenläufige Primer, dNTPs als Bausteine, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und den zugehörigen Puffer sowie ddH₂O (s. Tabelle 2.4). Als Template können genomische DNA, Plasmid-DNA und cDNA eingesetzt werden. Je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes, der Sequenz und der benötigten Genauigkeit bei der Amplifikation werden unterschiedliche DNA-abhängige DNA-Polymerasen benötigt. So wurde zur Klonierung die Pfu-Polymerase verwendet und bei den Kolonie-PCR bzw. Genotypisierungs-PCR die Dream-Taq DNA-Polymerase. Außerdem entscheidet die Länge des DNA-Fragmentes über die Dauer der Elongationszeit und die Primer über die Annealing-Temperatur (s. Tabelle 2.5). So wurden die Standardschemata je nach Anforderung und Template verändert.

Tabelle 2.4: Schema eines PCR-Ansatzes.

Reagenzien	Volumen [μ l]
Primer vorwärts (10 μ M)	0,75
Primer rückwärts (10 μ M)	0,75
dNTPs (10 mM je dNTP)	1,0
10 x Polymerase Puffer	5,0
DNA-Polymerase	0,5
ddH ₂ O	40,0
Template-DNA	2,0
Σ	50,0

Tabelle 2.5: Standardprogramm eines Thermocyclers für eine PCR.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturieren	95	10 min	1 x
Denaturieren	95	30 s	30-45 x
Annealing	45-65	30 s	
Elongation	72	45 s - 5 min	
Finale Elongation	72	10 min	1 x
Kühlen	4	∞	

Klonierungs-PCR

In einer Klonierungs-PCR wird der Fyco1-Einsatz aus einem Vektor amplifiziert. Die Primer sind so verändert, dass der Einsatz anschließend mit den passenden Restriktionsendonukleasen in den Klonierungsvektor eingebracht werden kann. Wichtig ist eine hohe Genauigkeit der DNA-abhängigen Polymerase.

Tabelle 2.6: Schema für den PCR-Ansatz der Klonierungs-PCR.

Reagenzien	Volumen [µl]
hFYCO1_Sall_f (10 µM)	1,5
hFYCO1_Sall_r (10 µM)	1,5
dNTPs (2 mM)	5,0
10 x Pfu Buffer+MgSO ₄	5,0
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	1,0
ddH ₂ O	34,55
pcDNA 3.1_Fyco1-HA (100ng)	1,45
Σ	50,0

Tabelle 2.7: Touchdown-PCR für die Klonierung.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturieren	95	10 min	1 x
Denaturieren	95	30 s	6 x 1 °C↓/Zyklus + 40 x
Touchdown-Annealing	65-60	45 s	
Elongation	72	5 min	
Finale Elongation	72	10 min	1 x
Kühlen	4	∞	

Kolonie-PCR

Um nach einer Transfektion die über Nacht gewachsenen Bakterienklone auf ihre Plasmid-DNA testen zu können, wird der Klon mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in einem PCR-Ansatz geschwenkt und dann in einer Flüssigkultur angezüchtet. In der Kolonie-PCR werden die Klone, welche die geeignete Plasmid-DNA enthalten, dadurch identifiziert, dass ein PCR-Produkt der richtigen Länge amplifiziert werden konnte.

Tabelle 2.8: Schema für den PCR-Ansatz der Kolonie-PCR.

Reagenzien	Volumen [μ l]
hFYCO1seq_4577f (10 μ M)	0,75
hGH5'_revers (10 μ M)	0,75
dNTPs (2 mM)	2,5
10 x Dream Taq Green Puffer	2,5
Dream-Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,5
ddH ₂ O	18,0
Bakterien-Klon	Im Ansatz schwenken
Σ	25,0

Tabelle 2.9: Touchdown-PCR für die Kolonie-PCR.

Reaktion	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturieren	95	10 min	1 x
Denaturieren	95	30 s	6 x 1 $^{\circ}$ C↓/Zyklus + 34 x
Touchdown-Annealing	65-60	30 s	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	10 min	1 x
Kühlen	4	∞	

Genotypisierungs-PCR

Nach Extraktion der genomischen DNA können gentechnisch veränderte Mäuse in der PCR dadurch identifiziert werden, dass ein PCR-Produkt aus dem veränderten Genbereich amplifiziert werden kann.

Tabelle 2.10: Schema für den PCR-Ansatz der Fyco1-PCR.

Reagenzien	Volumen [μ l]
FYCO1 forward (4020) (10 μ M)	0,7
hGH1pA/GT_R (10 μ M)	0,7
Rpl32_165_f	1,5
Rpl32_165_r	1,5
dNTPs (10 mM)	1,0
10 x Dream Taq Green Puffer	5,0
Dream-Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,25
ddH ₂ O	37,35
Template-DNA	2,0
Σ	50,0

Tabelle 2.11: Touchdown-PCR für die Fyco1-PCR.

Reaktion	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturieren	95	10 min	1 x
Denaturieren	95	30 s	6 x 1 $^{\circ}$ C↓/Zyklus + 30 x
Touchdown-Annealing	65-60	30 s	
Elongation	72	45 s	
Finale Elongation	72	10 min	1 x
Kühlen	4	∞	

Tabelle 2.12: Schema für den PCR-Ansatz der LC3-PCR.

Reagenzien	Volumen [μ l]
Primer Autoph_1 (10 μ M)	2,5
Primer Autoph_2 (10 μ M)	2,5
Primer Autoph_3 (10 μ M)	2,5
dNTPs (10 mM)	1,0
10 x Dream Taq Green Puffer	5,0
Dream-Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,63
ddH ₂ O	33,87
Template-DNA	2,0
Σ	50,0

Tabelle 2.13: PCR für die LC3-Genotypisierung.

Reaktion	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturieren	95	10 min	1 x
Denaturieren	95	30 s	30 x
Annealing	60	30 s	
Elongation	72	1 min	
Finale Elongation	72	10 min	1 x
Kühlen	4	∞	

2.2.3.6 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die doppelsträngige DNA hydrolytisch spalten können. Diese Restriktionsenzyme erkennen palindromisch aufgebaute Sequenzen und spalten die Doppelstränge entweder glatt („blunt“) oder versetzt („sticky ends“) ab. Für den Verdau wurden die Ansätze wie in Tabelle 2.14, Tabelle 2.15 und Tabelle 2.16 und pipettiert und anschließend bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Durch Erhitzen wurden die Enzyme inaktiviert. Die Proben wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die entsprechende Bande extrahiert und aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.3.3 und Kapitel 2.2.3.4). Um Religationen zirkulärer DNA zu vermeiden, wird die Vektor-DNA nach dem Restriktionsverdau mit SAP (= shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Zu 1 μ g Vektor-DNA wurden 2 μ l SAP (1U/ μ l) gegeben, bei 37 $^{\circ}$ C für 30 min inkubiert und anschließend 10 min bei 65 $^{\circ}$ C inaktiviert.

Tabelle 2.14: Sall-Verdau.

Reagenzien	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit
Vektor-/ Fyco1-DNA (0,2 μ g/ μ l)	10,0	37	2 h
10 x Buffer O	2,5	65	20 min
Sall (10U/ μ l)	4,0		
ddH ₂ O	8,5		
Σ	25,0		

Tabelle 2.15: HindIII-Verdau.

Reagenzien	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit
Plasmid-DNA (1 µg/µl)	1,0	37	1 h
10 x Buffer R	2,0	80	20 min
HindIII (10U/µl)	0,15		
ddH ₂ O	16,85		
Σ	20,0		

Tabelle 2.16: NotI-HF™-Verdau.

Reagenzien	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit
Klon-DNA (1 µg/µl)	20,0	37	über Nacht
100 x BSA	1,2	65	20 min
10 x NEBuffer 4	12,0		
NotI-HF™ (20U/µl)	5,0		
ddH ₂ O	81,8		
Σ	120,0		

2.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Antagonisten der Restriktionsenzyme sind die Ligasen. Sie verbinden gesplante DNA-Stränge wieder miteinander. So erkennt die T4-DNA-Ligase zueinander komplementäre „blunt“ oder „sticky ends“ und verbindet sie ATP-abhängig mit einer Phosphodiesterbindung. Für den Reaktionsansatz wurde zunächst das Verhältnis der zu verbindenden DNA-Fragmente bestimmt und mit folgender Formel in die entsprechende Menge umgerechnet:

$$Insert [ng] = \frac{Vektor [ng] \times Insert [bp]}{Vektor [bp]} \times Verhältnis \left(\frac{Insert}{Vektor} \right)$$

Für die Klonierung des transgenen Mausmodells wurden der alpha-MHC-Vektor und der Fyco1-Einsatz zunächst mit Sall verdaut und im Anschluss folgendermaßen ligiert:

Tabelle 2.17: Ligation der Sall-verdauten DNA-Fragmente im Verhältnis 1:3 (Vektor:Einsatz).

Reagenzien	Volumen [µl]	Temperatur	Zeit
alpha-MHC-Vektor (100 ng)	3,0	RT	über Nacht
Fyco1-DNA (146 ng)	13,3	65 °C	10 min
10 x T ₄ Buffer	2,0		
T ₄ Ligase (1U/µl)	1,5		
ddH ₂ O	0,2		
Σ	20,0		

2.2.3.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop™ 2000 über Messung der optischen Dichte bestimmt. Um Verunreinigungen durch Proteine detektieren zu können, wurden die Absorptionen bei 280 nm, 260 nm und 230 nm Wellenlänge bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Für reine DNA sollte der Quotient aus 260/280 ~ 1,8 und der Quotient von 260/230 = 2,0-2,2 betragen.

2.2.3.9 LR-Reaktion und Klonierung des MYH7-Expressionskonstruktes

Mit der LR-Reaktion des Gateway®-Systems kann ein Einsatz aus einem Entry-Klon in einen Destinationsvektor überführt werden, um ein Expressionskonstrukt zu erhalten. So wurde für die Co-IP ein Entry-Klon, welcher MYH7 enthielt (pDON221_MYH7-WT mit Stop) in einen Destinationsvektor (pcDNA 3.1_NT-myc) kloniert, um MYH7 mit einem myc-Tag in HEK 293-A Zellen überexprimieren zu können. Es wurden 150 ng des Entry-Klons und 300 ng des Destinationsvektors eingesetzt und ad 8 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Anschließend wurden 2 µl LR-Clonase™ II hinzugefügt und bei 25 °C über Nacht im Thermomixer inkubiert. Um die Reaktion zu inaktivieren, wurde 1 µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert.

Das fertige Konstrukt (pcDNA 3.1_MYH7-myc) wurde in DH10B *E. coli* transformiert, auf Selektivnährböden ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Die gewachsenen Bakterienklone wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einem LB-Flüssigmedium über Nacht für eine Mini-Prep angezüchtet. Die isolierte Bakterien-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym SbfI für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Bei enthaltenem MYH7-Einsatz wurde die Vektor-DNA an zwei Stellen geschnitten, sodass sich nach der Agarose-Gelelektrophorese zwei DNA-Banden der entsprechenden Länge darstellen ließen. Bei diesem Bakterien-Klon wurde DNA zu Sequenzierung eingeschickt und eine Midi-Prep durchgeführt, um nach Transfektion in HEK-Zellen einen Expressionsnachweis im myc-Blot zu verifizieren.

2.2.3.10 Klonierung des transgenen Mausmodells

Transgene Mäuse sind gentechnisch veränderte Organismen, deren Erbgut gezielt verändert wurde. Allerdings geschieht der Einbau der fremden DNA, dem Transgen, ungerichtet und kann nicht vorhergesehen werden, sodass optimalerweise zwei unabhängige Mausmodelle einen vergleichbaren Phänotyp zeigen, der unabhängig von dem Locus des Transgens im Erbguts ist.

Die Klonierung erfolgte mittels eines veränderten pBluescript-II-Vektors (pBS SKII+), in den ein α MHC-Promoter, ein Flag-Tag und eine hGH1-Kassette (hGH1 = human growth hormone 1) eingebracht waren (s. Abbildung 3-1). Durch den α MHC-Promoter wurde eine herzspezifische Expression des Gens gewährleistet (Subramaniam et al. 1991). Das Flag-Tag ist ein Oligopeptid mit acht Aminosäuren der Reihenfolge DYKDDDDK und die hGH1-Kassette kodiert für den Poly(A)-Schwanz aus dem Gen des humanen Wachstumshormons. Der Fyco1-Einsatz lag in einem pcDNA3.1 Expressionsvektor mit einem N-terminalem HA-Tag vor, welcher nach Transfektion in HEK293-A-Zellen Fyco1 exprimierte. Der Nachweis wurde im

HA-Blot gezeigt. Beide Vektoren wurden vor der Klonierung gründlich sequenziert und mit den Referenzen verglichen (NM_024513.3, Homo sapiens FYVE and coiled-coil domain containing 1 (FYCO1), mRNA). In einer touch-down-PCR wurde der Fyco1-Einsatz aus dem Expressionsvektor mittels der Pfu-Polymerase und den Primern hFYCO1_Sall_f sowie hFYCO1_Sall_r amplifiziert und über die Primer an beiden Enden mit einer Sall-Schnittstelle versehen (s. Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7). Statt des HA-Tags wurde ein Stop-Codon eingefügt, sodass das Konstrukt über keinerlei Tags verfügte. Nach dem Aufreinigen des PCR-Produktes wurde der Fyco1-Einsatz sowie der alpha-MHC-Vektor mit dem Restriktionsenzym Sall verdaut (s. Tabelle 2.14). Nach dem Auftragen auf ein Agarosegel und der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Extraktion und Aufreinigung der verdauten Produkte. Um eine Religation zu verhindern, wurde der alpha-MHC-Vektor mittels SAP dephosphoryliert. Die Ligation erfolgt im 1:3-Verhältnis (s. Tabelle 2.17) bei RT über Nacht und wurde nach Transformation in elektrokompatible E. Coli (DH10B) mittels Kolonie-PCR (s. Tabelle 2.8 und Tabelle 2.9) und HindIII-Verdau (s. Tabelle 2.15) der gewachsenen Klone verifiziert. Dieses Konstrukt wurde ebenfalls sequenziert und zur Vorbereitung auf die Mikroinjektion mit der Restriktionsendonuklease NotI-HF™ verdaut (s. Tabelle 2.16 und Abbildung 3-1, B). Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das verdaute Konstrukt aus dem Gel extrahiert. Nach einer aufwendigen Aufreinigung der DNA konnte das fertige Konstrukt in einer Konzentration von 39 µg/ml zur Mikroinjektion an das IBF/ Biotechnologie Labor der Universität Heidelberg versandt werden.

2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - RNA

2.2.4.1 RNA-Isolierung aus Gewebe mit QIAzol

Die RNA wurde aus der Herzspitze isoliert. Diese wurde nach der Organentnahme in einem 2 ml Röhrchen zunächst in flüssigem Stickstoff, dann bei -80 °C gefroren. Für die RNA-Extraktion wurde das Gewebe auf Eis aufgetaut, 1 ml QIAzol Lysis Reagent in das Röhrchen gegeben und die für den Gewebehomogenisator Precellys® 24 von Peqlab Biotechnologie notwendigen Keramikkugeln (ø 1,4 und 2,8 mm) hinzugegeben. Die Proben wurden 2 x für 20 s bei 5.500 rpm geschüttelt, bis das Herz vollständig zerkleinert war. Anschließend wurden sie für 10 min mit 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellreste zu trennen und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung der RNA wurden nun 200 µl Chloroform hinzugegeben, vorsichtig geschüttelt, für 2-3 min bei RT inkubiert und für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 für 30 min bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (10 min bei 12.000 g und 4 °C) und das Pellet mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol/ DEPC-H₂O gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation (5 min, 7.500 g, 4 °C) und dem Entfernen des Ethanol wurde das Pellet bei Raumtemperatur für circa 5 min getrocknet und mit 40 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Die Konzentration konnte im Spektrophotometer NanoDrop™ 2000 gemessen werden (vgl. Kapitel 2.2.3.8).

5 µg der Probe wurden zum DNA-Verdau eingesetzt. Diese wurden in einem 50 µl Ansatz zusammen mit 5 µl DNase I sowie 5 µl 10 x Reaktionspuffer in DNase/RNase-freiem Wasser (DEPC-H₂O) für 15 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit DEPC-H₂O ad 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Diese wurde gründlich gevortext und für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erreichen. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat über Nacht bei -20 °C gefällt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm und 4 °C, wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, um anschließend mit 12 µl DEPC-H₂O resuspendiert zu werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte vergleichbar zum Kapitel 2.2.3.8.

2.2.4.2 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase

Die RNA wurde mit dem Superscript® III First Strand Kit von Invitrogen in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA ad 12 µl mit DEPC-H₂O in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Hinzu kamen 1 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl Random Hexamer Primer (250 ng/µl) je Ansatz, der für 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend für mindestens 1 min auf Eis gelagert wurde. Dann wurden 4 µl 5 x First Strand konzentrierter Reaktionspuffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 0,5 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl) je Ansatz hinzugegeben, durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert. Dieser Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler zunächst bei 25 °C für 10 min, dann bei 50 °C für 60 min und abschließend bei 70 °C für 15 min zur Inaktivierung inkubiert. Danach wurde der Ansatz ad 200 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt, sodass die cDNA in einer Konzentration von 10 ng/µl vorlag und so für die qRT-PCR verwendet werden konnte.

2.2.4.3 Quantitative Real-time PCR

Um die Transkripte der Gene quantifizieren zu können, wurde die Real-time PCR (qRT-PCR) eingesetzt. Zur Analyse des „hypertrophen Genprogramms“ (Dorn et al. 2003) (Molkentin et al. 1998) *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1* wurde eine Multiplex-PCR nach dem TaqMan™ Prinzip verwendet. Dabei können mehrere Transkripte in einem Reaktionsansatz mittels verschiedener Fluorophore gemessen werden. Dieses System verwendet neben den

spezifischen Primern sogenannte Sonden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Cy5, FAM, HEX, Texas Red) und einem Quencher versehen sind. Ist der Quencher in ausreichender Nähe zum Reporter, wird die Fluoreszenz durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET = Förster-Resonanzenergietransfer) unterdrückt. Die Sonde hybridisiert bei jedem PCR-Zyklus mit dem komplementären DNA-Strang und die Taq-Polymerase synthetisiert an den Primern den doppelsträngigen DNA-Strang. Über eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität wird das 5'-Ende der Sonde abgebaut, sodass die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr durch den Quencher gelöscht wird und vom CFX96™ Real-Time PCR Detection System gemessen werden kann. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zur vorhandenen cDNA der Probe. Für die Multiplex-PCR wurden die Primer mit den entsprechenden Sonden je Transkript (s. Kapitel 2.1.6.4) in einem Mix verwendet und wie in Tabelle 2.18 angesetzt. Auf einer speziellen PCR-Platte wurden 18 µl/Well vorgelegt und 2 µl/Well der cDNA aus Kapitel 2.2.4.2 hinzugegeben. Jede Probe wurde im Duplikat pipettiert und gemessen. Das Programm für die Messungen qRT-PCR im CFX96™ Real-Time PCR Detection System ist in Tabelle 2.19 dargestellt.

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz für die Multiplex qRT-PCR.

Reagenzien	Volumen [µl]
iQ Powermix	10,0
RPL32 Mix (Texas Red)	0,5
Nppa Mix (FAM)	0,5
Nppb Mix (HEX)	0,5
Rcan1-4 Mix (Cy5)	0,5
ddH ₂ O	6,0
cDNA	2,0
Σ	20,0

Tabelle 2.19: Programm für die Multiplex qRT-PCR.

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiales Denaturieren	95	2 min	1 x
Denaturieren	95	15 s	40 x
Annealing/Elongation/ Messung der Platte	60	45 s	

Anhand dieser Messungen wurden die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) pro Zyklus der qPCR für jeden Reaktionsansatz ermittelt, als Graphen aufgetragen und mit dem Konzept des Threshold Cycle (Ct, Schwellen-Zyklus) quantifiziert. Der Threshold Cycle beschreibt den Teil des Graphen, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über den Hintergrundwert ansteigt. Um genaue Ergebnisse zu liefern, sollte der Threshold Cycle im exponentiellen Teil des Graphen liegen. Für die Normalisierung der Transkripte auf das Referenzgen *RPL32* und deren relative Quantifizierung erfolgte die Auswertung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Zunächst wurden die Ct-Werte des Referenzgens (*RPL32*) vom Ct-Wert des Zielgens subtrahiert und so der ΔC_t -Wert gebildet. Von diesen ΔC_t -Werten wird der Mittelwert der ΔC_t -Werte der

Referenzgruppe abgezogen. Dies bildet den $\Delta\Delta C_t$ -Wert. Um eine n-fache Regulation beschreiben zu können, wurde der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert als foldchange I gebildet. Wird jeder der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte durch den Mittelwert des foldchange I der Vergleichsgruppe geteilt, so erhält man den korrigierten foldchange II, bei dem die Expression der Vergleichsgruppe dem Wert 1 entspricht.

2.2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden - Proteinbiochemie

2.2.5.1 Extraktion von Protein aus Zellen

48 Stunden nach Transfektion wurde das Kulturmedium vorsichtig abgenommen und die Zellen zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Für eine 6-Well-Platte wurden 150 μ l/Well und in einer 10cm-Schale 1 ml Kern-Lyse-Puffer und Inhibitoren verwendet. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Unterfläche mechanisch gelöst, das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Zur thermischen Lyse der Zellen wurde dreimaliges Auftauen bei 37 °C für 10 min im Thermomixer und anschließendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff für 30 min angewandt. Das Zelllysate wurde für 20 min bei 4 °C und 18.000 g zentrifugiert und der Überstand, in dem die Proteine enthalten sind, in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.2 Extraktion von Protein aus Gewebe

Nach der Organentnahme des Herzens wurde es in drei Teile geteilt. Die Herzbasis wurde für die Proteinanalysen verwendet und in ein 2 ml Röhrchen überführt. Die Proben wurden erst in flüssigem Stickstoff und langfristig bei -80 °C tiefgefroren. Zur Aufreinigung wurden die Proben auf Eis gelagert und mit 1000 μ l des Kern-Lyse-Puffers inklusive der Inhibitoren aufgefüllt. Für den Gewebehomogenisator Precellys® 24 von Peqlab Biotechnologie wurden die Röhrchen mit kleinen (\varnothing 1,4 mm) und großen (\varnothing 2,8 mm) Keramikugeln befüllt und die Proben 2 x für 20 s bei 5.000 rpm sowie 1 x 30 s bei 6.000 rpm geschüttelt, bis das Herz vollständig zerkleinert war. Die Röhrchen wurden anschließend bei 4 °C für 15 min mit 14.000 rpm zentrifugiert, um das Protein von den Zellresten zu trennen und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bis zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford (s. Kapitel 2.2.5.3) bei -80 °C.

2.2.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford 1976). Es wurde eine Standardreihe mit BSA in den Konzentrationen 2,56 μ g/ μ l, 1,28 μ g/ μ l, 0,64 μ g/ μ l und 0,32 μ g/ μ l angelegt. Als Blank wurde ddH₂O verwendet. Dann wurden je 2 μ l

des Blanks, der Standardreihe und der Probe als Triplett auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Proben mussten gegebenenfalls vorher verdünnt werden, damit die Konzentration in der Standardreihe liegt. Anschließend wurden 200 µl Protein Assay-Reagenz luftblasenfrei hinzugegeben und für 5 min geschüttelt, um dann im Photometer der Firma Tecan bei 595 nm Wellenlänge gemessen zu werden (OD_{595nm}). Lag die Konzentration der Proben in der Standardreihe, konnte die Konzentration anhand der Regressionsgeraden berechnet werden. Dabei sollte der r-Wert, welcher die Regression angibt, $>0,97$ sein.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennen zu können, wird die SDS-PAGE verwendet. Damit die Ladung der Proteine im elektrischen Feld keine zusätzliche Komponente bildet, wird den Proben vor der Elektrophorese Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) hinzugegeben, welches sich den Proteinen anlagert und ihnen eine einheitliche, negative Ladung verleiht. Nach dem Denaturieren der Proben durchlaufen sie in einem angelegten, vertikalen Spannungsfeld zwei verschiedene Polyacrylamid-Gele in Richtung der Anode. Ein geringer vernetztes Sammelgel, welches die Proteine zunächst auf einer Höhe konzentriert und darunter ein stärker vernetztes Trenngel, welches der eigentlichen Auftrennung der Proteine dient. Kleine Proteine durchlaufen dieses schneller als große Proteine.

Für die Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN Tetra Elektrophorese-System von Bio-Rad verwendet. Nachdem die Glasplatten mit Wasser und 70 % (v/v) Ethanol gereinigt worden waren, wurden sie in die entsprechenden Rahmen eingespannt. Die Lösungen zur Herstellung des jeweiligen Polyacrylamid-Gels wurden – wie in Tabelle 2.20 und Tabelle 2.21 gezeigt – hergestellt. Je nach Molekulargewicht des Proteins, welches anschließend detektiert werden sollte, wurde ein niedrigprozentiges (große Proteine) oder hochprozentiges (kleine Proteine) Trenngel gewählt. Durch das Zugabe von 10 % APS und TEMED polymerisierte das Acrylamid zu einem Gel. Zuerst erfolgte die Herstellung des Trenngels, welches luftblasenfrei in den 1,5 mm breiten Spalt zwischen den Glasplatten bis etwa 2 cm unter den Rand gegeben wurde. Um eine glatte Gelgrenze zu erzielen, wurden 1.000 µl Isopropanol überschichtet, welches nach Abschluss der Polymerisation (ca. 20 min) abgegossen und entfernt wurde. Danach wurde das Sammelgel hergestellt und in den Glasspalt bis zur oberen Kante der Glasplatten gefüllt. Der gewünschte Kamm für 10 oder 15 Taschen wurde zügig eingesteckt und die Ränder mit Sammelgellösung abgedichtet. Nach Abschluss der Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Gel in eine Kammer eingespannt und mit 1 x SDS Laufpuffer überschichtet. Nun konnte der Kamm entfernt und die Taschen gespült werden, um Gelreste zu entfernen. Die Proben wurden mit 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und in die Taschen des Gels gegeben. Als Marker wurde entweder der

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder oder der Marker Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet. Die Elektrophorese erfolgte im 1 x SDS Laufpuffer bei konstanter Voltzahl zunächst mit 80 V, um die Proben im Sammelgel zu konzentrieren und anschließend je nach Prozentigkeit und Größe des Proteins mit 100-150 V.

Tabelle 2.20: Angaben zur Herstellung eines Trenngels.

Lösungen	7 % Gel [ml]	10 % Gel [ml]	12 % Gel [ml]
30 % (w/v) Acrylamid [ml]	2,3	3,3	4,0
Trenngel-Puffer [ml]	2,6	2,6	2,6
ddH ₂ O [ml]	4,9	3,9	3,2
TEMED [μl]	30,0	30,0	30,0
10 % (w/v) APS [μl]	60,0	60,0	60,0

Tabelle 2.21: Angaben zur Herstellung eines Sammelgels.

Lösungen	Volumen [ml]
30 % (w/v) Acrylamid	0,8
Sammelgel-Puffer	1,4
ddH ₂ O	2,9
TEMED	15,0
10 % (w/v) APS	30,0

2.2.5.5 Western Blot und Immunodetektion

Elektrotransfer

Um die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran zu transferieren, wurde das Tetra Blotting Modul von Bio-Rad für die sogenannte „Sandwich-Technik“ verwendet. Das Polyacrylamid-Gel wurde aus den Glasplatten genommen, das Sammelgel entfernt und das Trenngel folgendermaßen in ein „Sandwich“ gelegt: In einer Schale, die mit 1 x Transferpuffer gefüllt war, wurde eine Transferkassette gelegt. In diese wurde erst ein Schwamm, darauf drei Lagen Filterpapier und dann das Trenngel gelegt. Danach konnte die vorher für 5 min in Methanol aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Trenngel gelegt werden. Anschließend kamen wieder 3 Lagen Filterpapier sowie ein Schwamm in die Kassette. Nun wurden letzte Luftblasen mit einem Falcon-Röhrchen ausgestrichen und die Transferkassette dicht verschlossen in den Tank eingesetzt. Dieser wurde mit 1 x Transferpuffer befüllt und mit Eis gekühlt. Der Transfer wurde für 90-120 min bei einer Stromstärke von 350-400 mA durchgeführt. Anschließend wurde die geblottete Membran für mindestens 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht in einer TBST-Lösung mit 5 % (w/v) Milchpulver geblockt.

Immunchemischer Nachweis

Als nächstes wurde der Primärantikörper (s. Kapitel 2.1.4.1) in der gewünschten Verdünnung in der TBST- Milchpulver-Lösung angesetzt und mit der Membran in einem 50 ml Falcon-Röhrchen bei 4 °C über mindestens 4 Stunden auf einem Rollmixer gewendet. Dann wurde die Membran 3 x für mindestens 5 min mit einer 1 x TBST-Lösung gewaschen und mit dem HRP (horseradish peroxidase) gekoppelten speziesspezifischen Sundärantikörper (s. Kapitel 2.1.4.2) inkubiert. Dieser wurde wie der Primärantikörper angesetzt und für mindestens 1 h bei 4 °C mit der Membran auf dem Rollmixer geschwenkt. Es folgten wieder drei Waschschrte, bevor die Membran detektiert werden konnte.

2.2.5.6 Ecl-Detektionssystem

Mit dem Enhanced-Chemiluminescence (ECL) System von GE Healthcare können die HRP-gekoppelten Sundärantikörper detektiert werden. Die „Meerrettich-Peroxidase“ HRP oxidiert dabei das Substrat Luminol der ECL-Lösung. Dies erzeugt eine Chemilumineszenz, die bei 425 nm Wellenlänge detektiert werden kann. Die Menge des detektierten Lichts korreliert mit der Menge des geblotteten Proteins, sodass eine Quantifizierung möglich ist. Die Reaktion erreicht nach 5 min ihre maximale Lichtemission, die anschließend langsam wieder abnimmt.

Es wurden die ECL-Lösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt und für 5 min auf der Membran inkubiert. Mit der Alpha Innotech Multimage III konnten die jeweiligen Lichtemissionen auf Höhe der Proteinbanden detektiert und in der AlphaView Software mittels Densitometrie quantifiziert werden.

2.2.5.7 Co-Immunopräzipitation

Zur Co-Immunopräzipitation (Co-IP) wurden HEK 293-A Zellen in drei 10cm-Schalen in antibiotikafreiem Medium ausgesät. Waren die Zellen etwa 80 % konfluent, wurden sie mit folgenden Ansätzen transfiziert:

Tabelle 2.22: Transfektionsansätze für Co-IP von Fyco1 und MYH7.

Ansatz	Konstrukt 1 [12 µg]	Konstrukt 2 [12 µg]	WB: Fyco1	WB: MYH7
1	pcDNA 3.1_Fyco1-HA	pcDNA 3.1_MYH7-myc	+	+
2	pcDNA 3.1_Fyco1-HA	pcDNA3.1/NT-myc	+	-
3	pcDNA3.1/NT-HA	pcDNA 3.1_MYH7-myc	-	+

Je Ansatz wurden 12 µg/Konstrukt, also insgesamt 24 µg DNA/Schale verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Wechsel auf selektives, antibiotikahaltiges Medium (DMEM Advanced + L-Glutamin, + Pen./ Strep., + 4% FCS). 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte

die Ernte mit einem speziellen, Detergenzien-armen Puffer. Bei der schonenden Aufreinigung wurde das Lysat beim wechselnden Einfrieren und Auftauen nicht bei 37 °C im Thermomixer, sondern bei RT aufgetaut und nicht gevortext.

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Reagenz (s. Kapitel 2.2.5.3) wurden zwei 50 µg je Ansatz als Ladekontrollen abgenommen und 1,6 mg Protein je Ansatz zur Co-IP verwendet. Diese wurden mit 5 µg Antikörper (1 µl anti-HA) über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationsmischer inkubiert. Zur gleichen Zeit wurden die Dynabeads® vorbereitet. 50 µl Dynabeads® wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und mittels Magnetständer vom Überstand getrennt. Anschließend wurden 750 µl des Co-IP Lyse-Puffers hinzugegeben, gevortext und mit Hilfe des Magnetständers wieder abgenommen. Die Dynabeads® wurden in 750 µl einer 5%igen BSA in PBS Lösung zum Blocken der unspezifischen Bindungen ebenfalls über Nacht bei 4 °C auf einem Rotationsmischer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die BSA/PBS-Lösung wieder abgenommen und die Dynabeads® mit dem Protein-Antikörper-Ansatz für vier Stunden auf dem Rotationsmischer bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Protein-Antikörper-Ansatz abgenommen und die Dynabeads® fünf Mal mit 750 µl Ripa-Puffer gewaschen. Je Ansatz wurden 40 µl eines zweifach konzentrierten Proben-Puffer nach Laemmli inklusive 1 µl 1 M DTT hinzugegeben und im Thermomixer bei 95 °C für 5 min inkubiert. Mittels Magnetständer wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die SDS-PAGE verwendet.

2.2.6 Tierversuche

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes lag vor.

2.2.6.1 Haltung

Die Versuchstiere wurden im Tierhaus auf dem Gelände des Uniklinikums Kiel untergebracht. In speziellen Käfigen hatten sie jederzeit Zugang zu standardisiertem Trockenfutter und Trinkwasser. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden. Die Raumtemperatur wurde zwischen 23-25 °C gehalten.

2.2.6.2 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde von Dr. Kuhn aus der Klinik für Innere Medizin III des UKSH in Kiel durchgeführt. Er war hinsichtlich des Genotyps der Mäuse verblindet. Dazu wurden die Tiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran sediert. Das Fell am Thorax wurde für bessere Schallbedingungen enthaart und die Maus auf einer Wärmematte gelagert, um die

Körpertemperatur konstant zu halten. Für die Basischarakterisierung wurde das Vevo 1100 imaging system mit dem MS400 Schallkopf (18-38 MHz, VisualSonics) verwendet. Die Echokardiographien der Tiere – mit und ohne aortaler Konstriktion – wurden mit dem Vivid 7 System (GE Healthcare) durchgeführt. Dafür wurde der I13L Schallkopf (14.1 MHz, GE Healthcare) verwendet. Von jedem Tier wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und der Mittelwert pro Tier für die statistische Auswertung verwendet. Diese Mittelwerte wurden zwischen den transgenen Tieren und den Wildtyp-Mäusen verglichen und statistisch ausgewertet. Über den Genotyp der zu schallenden Tiere war der Untersucher nicht informiert.

Im M-Mode wurden die Wandstärken des Septum (Interventricular Septum, IVS), der linksventrikuläre Diameter (Left Ventricular Internal Diameter, LVID) und die Stärke der linksventrikulären Hinterwand (Left Ventricular Posterior Wall, LVPW) sowohl während der Diastole (d) als auch während der Systole (s) gemessen. Außerdem wurden in dem Versuch die Diameter der linksventrikulären Ausflussbahn in der kurzen und langen parasternalen Achse, sowohl in der Diastole, als auch in der Systole vermessen. Das Fractional Shortening (FS) wurde in der kurzen parasternalen Achse wie folgt aus den echokardiographisch ermittelten Parametern berechnet: $FS [\%] = (LVIDd - LVIDs) / LVIDd \times 100$.

Im B-Mode wurden Schnittbilder auf Höhe der Papillarmuskeln in der langen parasternalen Achse aufgenommen und vermessen. Damit wurden in dem Versuch die Volumina des linken Ventrikels am Ende der Systole und Diastole sowie die Ejektionsfraktion (EF) wie folgt bestimmt: $EF [\%] = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100$.

Im PW-Doppler wurde das E/A-Verhältnis über der Mitralklappe bestimmt.

2.2.6.3 Aortale Konstriktion der A. transversa (TAC)

Die Operation wurde von Dr. Kuhn aus der Klinik für Innere Medizin III des UKSH in Kiel durchgeführt. Zur Konstriktion der A. transversa zwischen Truncus brachiocephalicus und A. carotis communis sinistra wurde der Maus zur Analgesie eine Initialdosis von 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. injiziert. Die Anästhesie wurde nach Intubation mit 4 % (v/v) Isofluran eingeleitet und mit 2-3 % (v/v) fortgeführt. Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Frequenz von 120-130/min. Zur ständigen Kontrolle der Körpertemperatur wurde die Maus auf einem beheizbaren OP-Tisch gelagert und mit einem rektalen Thermometer versehen, sodass eine automatische Thermoregulation gewährleistet werden konnte. Zur Lokalanästhesie wurde Lidocain (5 mg/ml; 30 µl/25g Maus) zwischen die Rippen des linken Hemithorax gespritzt und der Bereich enthaart und desinfiziert. Entlang des 2. ICR erfolgte der ca. 0,5 cm lange Hautschnitt. Unter dem Operationsmikroskop erfolgte die stumpfe Präparation bis zum Aortenbogen sowie deren Mobilisation. Anschließend wurde ein 6.0

Polene-Faden um den Aortenbogen geschlungen, eine 26G-Nadel darauf platziert und beide mit einem Knoten ligiert. Die 26G-Nadel wurde rasch entfernt, sodass der Durchmesser der A. transversa nun 26G entsprach. Die Hautnaht wurde anschließend mit einem 5.0 Vicryl rapid (Ethicon) Faden durchgeführt. Bei den scheinoperierten Tieren wird bis auf die Ligatur der Aorta in gleicher Weise verfahren. Die OP-Dauer betrug etwa 15 min.

Postoperativ werden die Tiere für eine ungestörte Rekonvaleszenz alleine im Käfig gehalten sowie für 2 Tage oral analgetisch mit 0,01 mg/ml Buprenorphin im Trinkwasser behandelt. 14 Tage nach der Operation, erfolgte die echokardiographische Auswertung und die Organentnahme zur weiteren Aufarbeitung.

2.2.6.4 Gewebeentnahme

Die Organentnahme von Herz, Lunge und ggf. Leber sowie Tail und Tibia erfolgte nach zervikaler Dislokation mit dem Präparationsbesteck bestehend aus Pinzette und Schere. Das Herz wurde in 4 °C kaltem 1 x PBS gewaschen, anschließend mit Papiertüchern getrocknet und nach Entfernen der Vorhöfe gewogen. Anschließend wurden diese senkrecht zur Herzachse in drei Teile geteilt: Der mittlere Teil diente den Gewebeschnitten und wurde in Tissue Tek eingebettet, die Herzspitze der RNA-Aufbereitung und die Herzbasis der Proteinquantifizierung. Herzspitze und -basis wurden in 2 ml Röhrchen in flüssigem Stickstoff gefroren und langfristig bei -80 °C gelagert. Lunge und Leber wurden ebenfalls mit 1 x PBS gewaschen, mit Papiertüchern getrocknet und gewogen.

2.2.7 Histologie

2.2.7.1 Anfertigen von Kryostat-Gewebeschnitte

Nach der Organentnahme wurde das Herz in PBS gewaschen, mit Papiertüchern getrocknet und nach Abtrennen der Vorhöfe gewogen. Das Herz wurde in drei Teile geteilt, wobei der mittlere Teil des Herzens mit Tissue Tek von Miles Scientific eingebettet und das Gewebe in einer Kunststoffform ausgerichtet wurde. Die Aushärtung erfolgte auf Trockeneis und die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C.

Das Herzgewebe wurde mittels eines Mikrotoms für Kryoschnitte (Kryotom) aufgearbeitet und bei einer Arbeitstemperatur von -20 °C in 5 µm dünne Scheiben geschnitten, die auf einen Objektträger („superFrost Plus“, Menzel) aufgetragen, für 10 min in Aceton bei -20 °C fixiert und bei RT getrocknet wurden. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die fertigen Kryoschnitte bei -80 °C gelagert.

2.2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für diese Färbung wurden die Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin (H.E.-Färbung) verwendet. Es ist eine Übersichtsfärbung, um den allgemeinen Aufbau und Struktur des Gewebes beschreiben zu können. Hämatoxylin färbt dabei basophile/ saure Strukturen blau (DNA, Zellkerne, Ribosomen und rER), Eosin azidophile/ basische Strukturen rot (Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien, das sER und Kollagen).

2.2.7.3 Sirius Red/Fast Green Färbung

Für die Sirius-Red/Fast-Green-Lösung wurden 1,0 g Fast Green FCF und 0,5 g Sirius Red F3BA in 500 ml Pikrinsäure gelöst. Nachdem die Schnitte für 1 Stunde im Trockenschrank (60 °C) fixiert wurden, inkubierten sie für 1-4 Tage mit der Sirius-Red/Fast-Green-Lösung bei RT unter Lichteinschluss. Anschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe gewaschen und mit Entellan eingedeckt. Unter dem Mikroskop erscheint kollagenes Gewebe rot und nicht-kollagene Fasern grün.

2.2.7.4 Immunhistochemie

Die Schnitte wurden für die Basischarakterisierung für 10 min bei RT mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das fixierte Gewebe in eine feuchte Kammer überführt und mit 50 ml der FITC-konjugierten Lektin-Lösung von Sigma-Aldrich (0,5 µg/ml in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen und für 20 min mit 12 % BSA in PBS bei RT blockiert. Im nächsten Schritt wurde der α -Actinin-Antikörper in 2,5 % w/v BSA in PBS 1:500 verdünnt und auf das Gewebe aufgebracht. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Gewebeschnitte wurden dreimal mit PBS + 0,5 % Tween für jeweils 5 min gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper (anti-Maus-Alexa Fluor 546) 1:200 verdünnt in 2,5 % (w/v) BSA in PBS, inklusive DAPI (1:5.000) aufgebracht und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden abschließend zunächst zwei Mal für 5 min mit PBS + 0,5 % Tween, dann zwei Mal für 5 min mit dH₂O gewaschen. Nachdem sie unter Lichtabschluss getrocknet waren, wurden sie mit dem FluorPreserve™ Reagent Medium eingedeckt.

Unter dem Mikroskop wurde Actinin rot dargestellt und bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen. Lektin wurde grün dargestellt und in 40-facher Vergrößerung fotografiert. Zur Zellgrößenbestimmung wurden in ImageJ diejenigen Zellen umrundet, die eine nahezu kreisrunde Umrandung aufwiesen, um sicherzugehen, dass die Kardiomyozyten im

Querschnitt vermessen werden. DAPI diente der Darstellung der Zellkerne und wurde zur Orientierung genutzt.

Für die GFP-LC3 transgenen Tiere wurde zur Darstellung der Zellmembranen das AlexaFluor® 647 konjugierte Wheat Germ Agglutinin von Thermo Scientific verwendet. Unter dem Mikroskop wurde das GFP-LC3 grün und die Zellmembran magenta dargestellt und bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.2.8 Statistische Auswertung

2.2.8.1 Tests

Zur statistischen Auswertung der jeweiligen Methoden wurden die Mittelwerte der Ergebnisse und ihre Standardabweichungen berechnet. Diese wurden mit dem zweiseitigen, gepaarten Zweistichproben-t-Test, dem Mann-Whitney U-Test und dem zwei-Weg-ANOVA mit dem Student-Newman-Keuls-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Dazu wurde die Software SigmaPlot® 13.0 verwendet.

2.2.8.2 Normalisierung

Zur Normalisierung wurden je nach Verfahren weitestgehend unregulierte Kontrollen (Tubulin, *RPL32*) der jeweiligen Methoden verwendet und die Messungen des Proteins/ Transkriptes im Verhältnis zu dieser Kontrolle angegeben (z.B. Fyco1/Tubulin). Diese Verhältnisse wurden gegebenenfalls auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (z.B. WT) normalisiert, sodass eine n-fache Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe angegeben werden konnte.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Analyse der potentiell protektiven Effekte einer *in vivo* Überexpression von Fyco1 durch eine Induktion der kardialen Autophagie. Hierzu generierten und charakterisierten wir ein transgenes Mausmodell, das Fyco1 herzspezifisch überexprimiert. Da Fyco1-defiziente Mäuse unter kardialen Stress-Bedingungen durch eine Konstriktion der Aorta transversa eine aggravierte Dysfunktion des Herzens entwickelten, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob dies durch die Überexpression von Fyco1 vermindert werden kann. Des Weiteren sollten neue Bindungspartner für Fyco1 über Co-Immunopräzipitation gefunden werden, um neue Proteininteraktionen in der Autophagie zu erforschen.

3.1 Basischarakterisierung der Fyco1-TG Linien

Zunächst wurde ein transgenes Mausmodell, welches Fyco1 herzspezifisch überexprimiert kloniert und morphologisch, echokardiographisch, histologisch sowie molekular im Alter von zwölf Wochen charakterisiert. Anschließend wurde diese Charakterisierung mit Mäusen im Alter von einem Jahr durchgeführt.

3.1.1 Klonierung und Genotypisierung des neuen Mausmodells

Die Klonierung erfolgte mittels eines pBluescript-II-Vektors, in den ein α -MHC-Promoter, ein Flag-Tag und eine hGH1-Kassette (hGH1 = human growth hormone 1) eingebracht waren (Subramaniam et al. 1991) (s. Abbildung 3-1, A). Als Vorlage für die Klonierung von Fyco1 diente ein pcDNA3.1 Expressionsvektor mit einem N-terminalem HA-Tag. Mit einer „touch-down-PCR“ wurde die Fyco1-cDNA aus dem Expressionsvektor ohne HA-Tag mittels der Pfu-Polymerase amplifiziert und über die Primer an beiden Enden mit einer Sall-Schnittstelle versehen. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes wurde der α -MHC-Vektor mit dem Restriktionsenzym Sall verdaut. Nach dem Auftragen auf ein Agarosegel und der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Extraktion und Aufreinigung der verdauten Produkte. Um eine Re-Ligation des Plasmids zu verhindern, wurde der alpha-MHC-Vektor mittels SAP dephosphoryliert. Die Ligation des geschnittenen Vektors mit Fyco1 erfolgte über Nacht und wurde anschließend in elektrokompatible E. coli (DH10B) transformiert. Positive Klone wurden mittels einer Kolonie-PCR und einem HindIII-Verdau verifiziert. Der Vektor wurde anschließend sequenziert. Zur Linearisierung wurde das Konstrukt mit NotI-HF™ verdaut (s. Abbildung 3-1, B). Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das verdaut Konstrukt aus dem Gel extrahiert. Im Anschluss wurde die DNA gereinigt und das fertige Konstrukt zur Mikroinjektion an das IBF/ Biotechnologie Labor der Universität Heidelberg versandt.

A

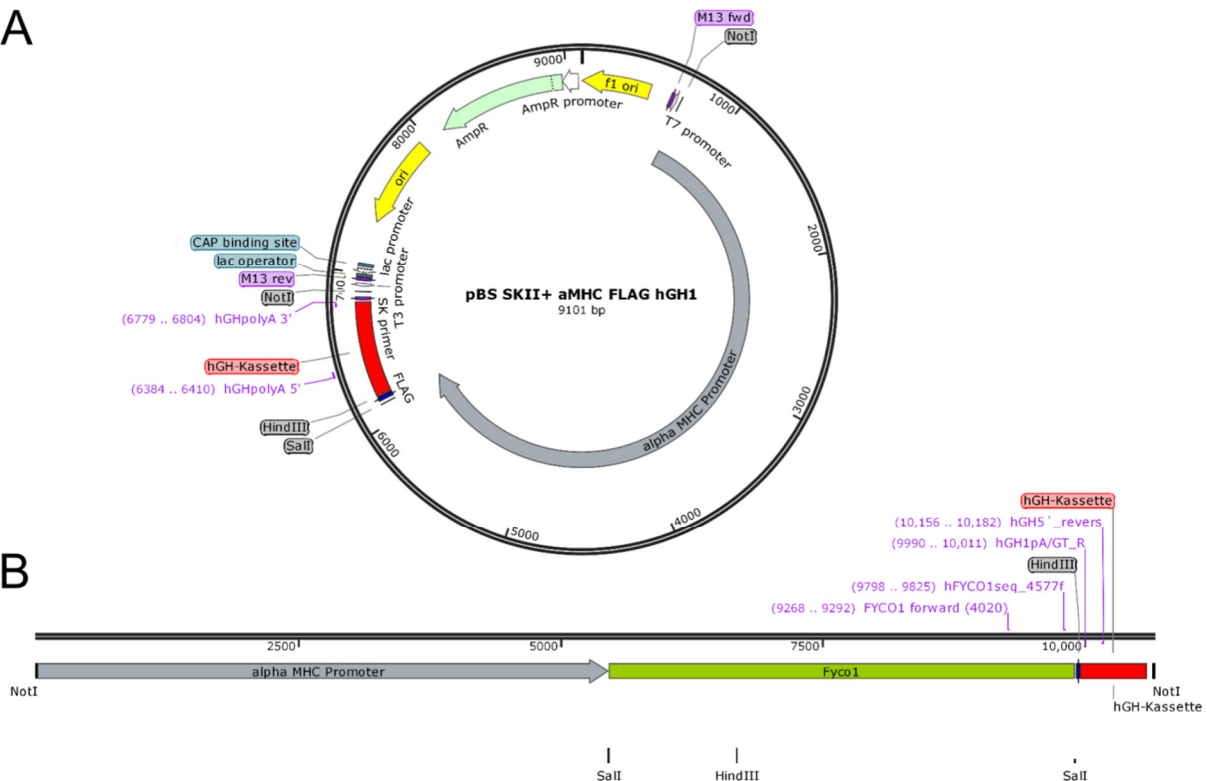


Abbildung 3-1: Vektorkarte und Fyco1-Einsatz zur Klonierung.

Abbildung erstellt mit SnapGene®. **A.** Vektorkarte vom pBSII+aMHCFLAGhGH, 9.101 Basenpaare (bp). αMHC Promoter (grau), FLAG-Tag (blau), hGH1-Kassette (rot), Ampicillin-Resistenz (mint). Bindungsstellen für Restriktionsenzyme: NotI, Sall, HindIII. **B.** Fyco1-Einsatz nach Ligation mit Vektor und nach NotI-Verdau, 10.655 Basenpaare (bp). αMHC-Promoter (grau), Fyco1-Einsatz (grün), FLAG-Tag (blau), hGH1-Kassette (rot). Bindungsstellen für Restriktionsenzyme: NotI, Sall, HindIII. Genotypisierungsprimer: Fyco1 forward (4020), hFYCO1seq_4577f, hGH1pA/GT_R, hGH5'_revers.

Nach der Mikroinjektion der DNA in mindestens 200 C57BL/6NCrI Oozyten *in vitro* sowie dem Ovidukttransfer der Embryonen in zehn pseudoträchtige, zyklussynchronisierte Empfängertiere, wurden sieben Mäuse trächtig und bekamen lebensfähigen Nachwuchs. Diese Nachkommen in der ersten Generation wurden auf die Integration des Fyco1-Konstrukts mittels PCR überprüft (s. Abbildung 3-2, B, Kapitel 0, Tabelle 2.10 und Tabelle 2.11). Sechs Nachkommen wurden dabei positiv getestet. Diese wurden weiter verpaart und als Linie A bis Linie F deklariert. Da eine Integration nicht zwangsläufig zu einer Transmission in die Keimbahn und zu einer Expression führt, wurden Tiere der zweiten Generation zunächst auf DNA-Ebene und dann auch Protein-Ebene überprüft (s. Abbildung 3-2, C). Zwei Linien zeigten sowohl transgene Nachkommen, als auch eine kardiale Fyco1-Überexpression auf Proteinebene und wurden als Linie A und Linie F etabliert (s. Abbildung 3-2, A). Diese Tiere wurden zur Basischarakterisierung der Linien morphologisch vermessen, echokardiographisch ausgewertet und das Herz zur weiteren Aufbereitung entnommen.

Nach mechanischer und chemischer Lyse des Gewebes und der Zellen wurden die isolierten Proteine aufgereinigt und im Bradford-Test quantifiziert (s. Kapitel 2.2.5.1 und 2.2.5.3). Anschließend wurden die Proben in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt und mittels Antikörper im Western Blot dargestellt (s. Kapitel 2.2.5.4 und 2.2.5.5). Nach Hybridisierung mit einem Antikörper, der gegen Fyco1 gerichtet ist, konnte die Überexpression auf Proteinebene verifiziert werden. Dabei zeigten sich zwischen der Linie A und der Linie F unterschiedliche Überexpressionen: In Linie A wurde Fyco1 durchschnittlich 13,1-fach ($p < 0,001$) und in Linie F 20,1-fach in den transgenen Tieren überexprimiert ($p < 0,001$). Die Überexpression in Linie F war signifikant höher als in den transgenen Tieren der Linie A ($p < 0,01$) (s. Abbildung 3-3).

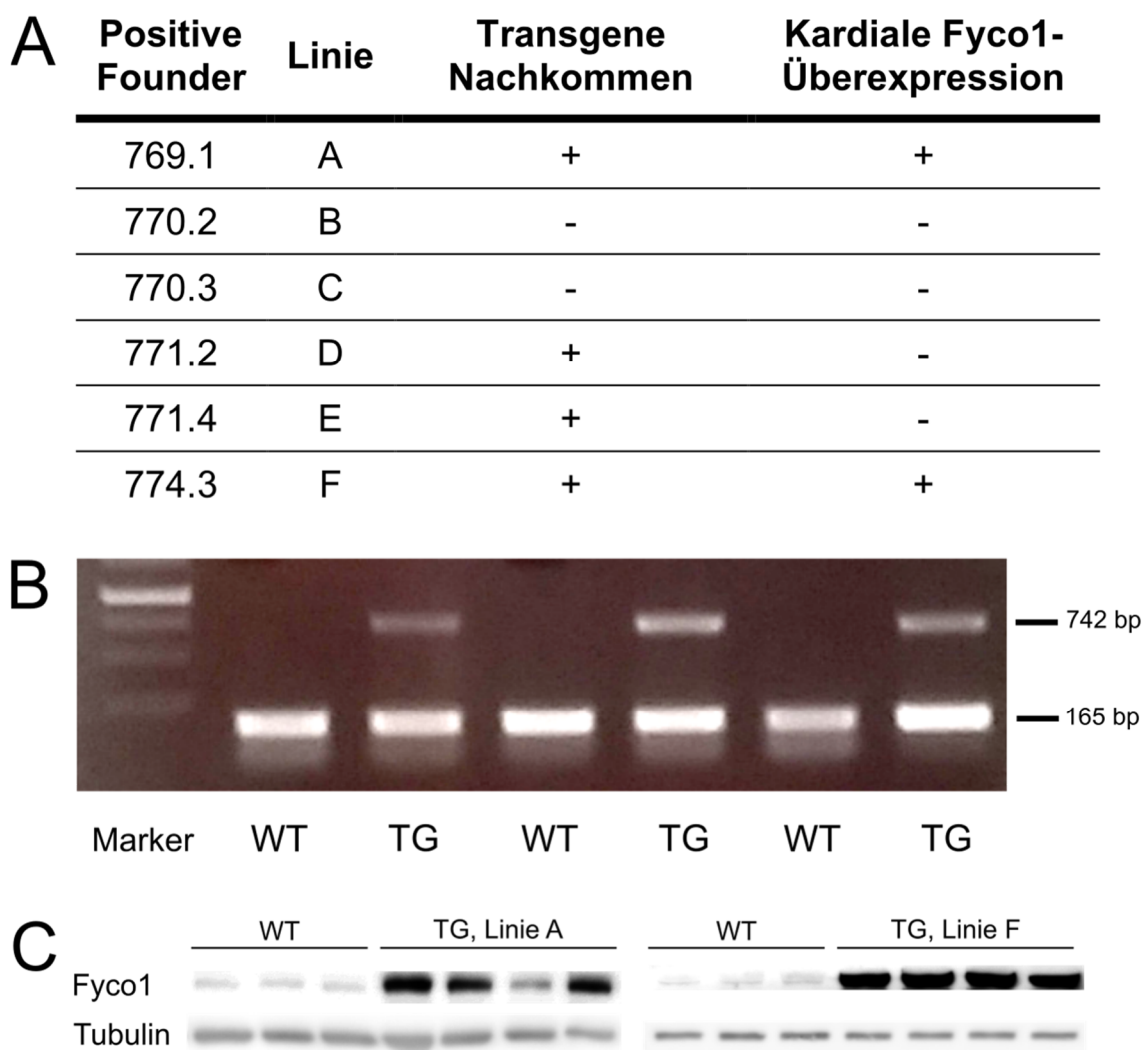


Abbildung 3-2: Genotypisierung der Nachkommen.

A. Verpaarung der sechs Tiere, bei denen mittels Genotypisierung-PCR das Fyco1-Konstrukt identifiziert werden konnte. Diese sind die Elterntiere der Linien A bis Linie F. Anschließend erfolgt die Genotypisierungs-PCR der

Nachkommen in der zweiten Generation. Bei positiver Genotypisierungs-PCR wird die kardiale Überexpression von *Fyco1* im Western Blot im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren verifiziert. Linie A und Linie F erfüllen beide Kriterien. **B.** Genotypisierungs-PCR der *Fyco1*-TG-Linien nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte. Die 742bp-Bande weist das *Fyco1*-Konstrukt nach. Die 165bp-Bande dient als endogene Kontrolle. **C.** Zwei Western Blots für *Fyco1* der Linie A und F im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwister-Tieren.

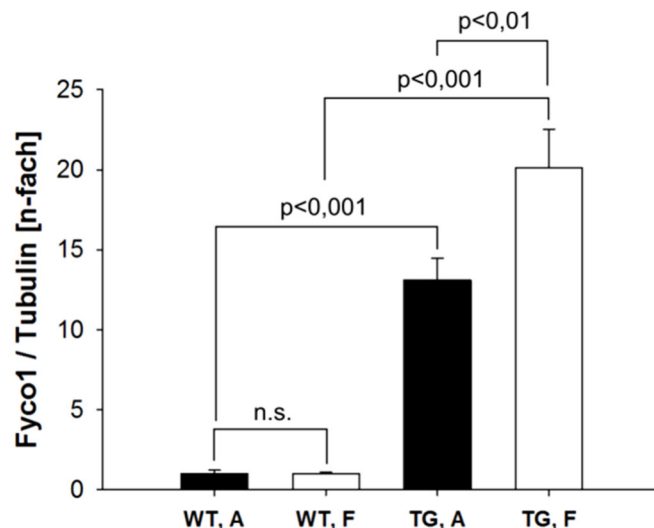


Abbildung 3-3: *Fyco1*-Expression der Linie A und Linie F.

Die Expression von *Fyco1* im Western Blot zeigt einen hochsignifikanten Unterschied in den transgenen Tieren (TG) beider Linien verglichen mit der *Fyco1*-Expression der jeweiligen Wildtypen (WT) ($p < 0,001$). Die transgenen Tiere der Linie F (*Fyco1*-TG, F) exprimieren signifikant mehr *Fyco1* als die transgenen Tiere der Linie A (*Fyco1*-TG, A) ($p < 0,01$). Folgende Stichprobenanzahl wurde ausgewertet: WT, A: Wildtypen der Linie A, $n=8$; WT, F: Wildtypen der Linie F, $n=10$; *Fyco1*-TG, A: *Fyco1*-transgene Tiere der Linie A, $n=9$; *Fyco1*-TG, F: *Fyco1*-transgene Tiere der Linie F, $n=12$.

3.1.2 Morphologischer Phänotyp der *Fyco1*-transgenen Mäuse

Die morphologische Phänotypisierung erfolgte im Alter von zwölf Wochen für die männlichen Tiere der Linien A und F. Sie umfasste das Wiegen des Körpergewichtes [g], Herzgewichtes [mg], Lungengewichtes [mg], Lebergewichtes [g] sowie der Länge der rechten Tibia [mm]. Das Lungengewicht dient als grobes Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion, da es bei einem Lungenödem erhöht ist. Ebenso ist das Lebergewicht ein Indikator für die rechtsventrikuläre Pumpfunktion. Bei einer Stauungsleber ist demzufolge das Gewicht der Leber erhöht. Als Maß für eine mögliche Hypertrophie des Herzens wird das Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht [mg/g] bzw. der Tibialänge [mg/mm] angegeben. Die transgenen Tiere wurden mit ihren Wildtyp-Geschwistertieren verglichen (s. Abbildung 3-4).

Dabei zeigte sich ein hochsignifikant größeres Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht bei den transgenen Tieren der Linie A und Linie F im Alter von zwölf Wochen ($p < 0,001$). Das

Verhältnis von Herzgewicht zu Tibiallänge war auch bei Linie F signifikant größer ($p < 0,01$). Da diese Werte als Maß für eine mögliche Hypertrophie herangezogen werden, könnten die transgenen Tiere demzufolge eine stärkere Herzhypertrophie entwickelt haben. Da sich die Gewichte von Lunge und Leber zwischen den transgenen Tieren und ihren Wildtyp-Geschwistertieren nicht unterscheiden, liegt morphologisch kein Hinweis auf ein Rechts- oder Linksherzversagen vor.

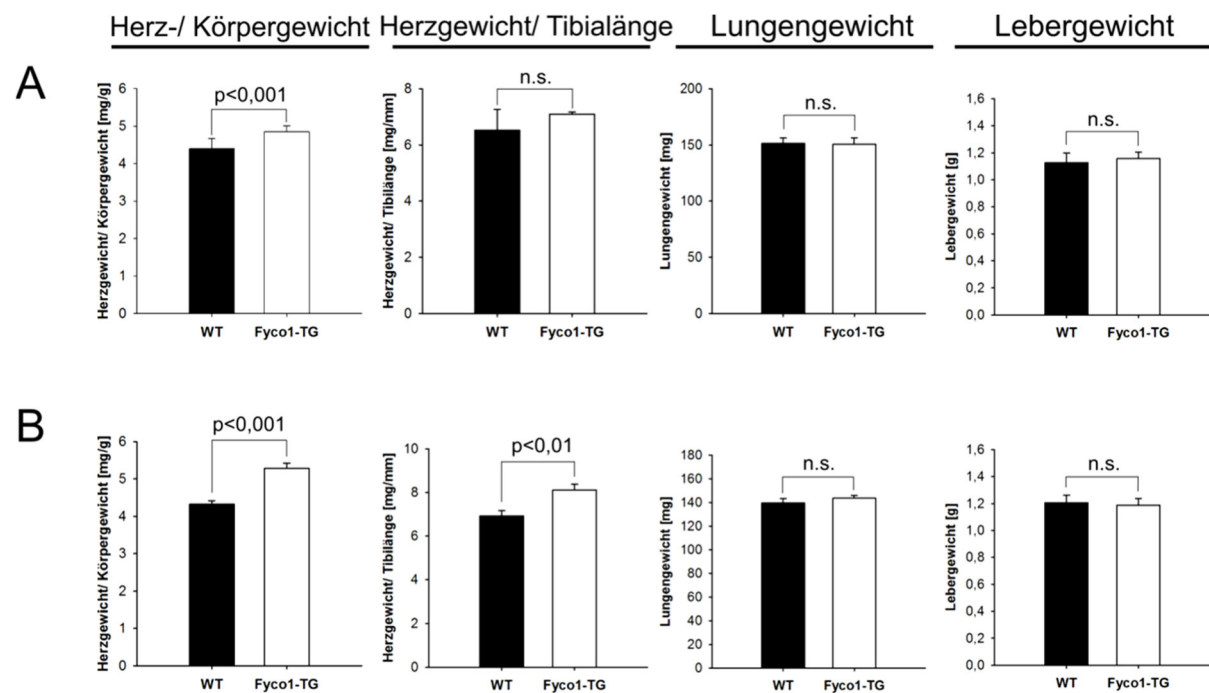


Abbildung 3-4: Morphologie der Tierlinien in der Basischarakterisierung.

Balkendiagramm zur Darstellung des morphologischen Phänotyps in Herzgewicht/Körpergewicht [mg/g], Herzgewicht/Tibiallänge [mg/mm], Lungengewicht [mg] und Lebergewicht [g] der Basischarakterisierung von Linie A und F im Alter von zwölf Wochen. WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus, n.s. = nicht signifikant, p = p-Wert. **A.** Linie A, WT: n=8; Fyco1-TG: n=9. Die Fyco1-TG haben einen hochsignifikant größeren Quotienten aus Herz-/Körpergewicht [mg/g] im Vergleich zu den Wildtypen ($p < 0,001$). Die schwereren Herzen der transgenen Mäuse könnten für eine kardiale Hypertrophie sprechen. Da sich die Gewichte von Lunge und Leber nicht unterscheiden, gibt es morphologisch keinen Anhalt für eine Rechts- oder Linksherzinsuffizienz. **B.** Linie F, WT: n=10; Fyco1-TG: n=9. Die Fyco1-TG haben ebenfalls einen hochsignifikant größeren Quotienten aus Herzgewicht/Körpergewicht [mg/g] ($p < 0,001$) sowie signifikant größeren Quotienten aus Herzgewicht/Tibiallänge [mg/mm] im Vergleich zu den Wildtypen ($p < 0,01$). Die schwereren Herzen könnten durch eine Hypertrophie durch die Fyco1-Überexpression bedingt sein. Lungen- und Lebergewichte unterscheiden sich hingegen nicht (n.s.), sodass es keinen Anhalt für eine klinisch apparente Herzinsuffizienz gibt.

3.1.3 Echokardiographie der Basischarakterisierung

Um die Herzfunktion zu untersuchen, wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und von Dr. Kuhn aus der Klinik für Innere Medizin III transthorakal geschallt (s. Kapitel 2.2.6.2 und Abbildung 3-5).

Dabei zeigten die transgenen Tieren der Linie A einen nur geringfügig größeren linksventrikulären, enddiastolischen Innendurchmesser (LVIDd, $p=0,046$). Bei den transgenen Tieren der Linie F waren das interventrikuläre Septum in der Diastole (IVSd, $p=0,02$) sowie die linksventrikuläre Hinterwand in der Diastole (LVPWd, $p<0,001$) gegenüber den Wildtyp-Mäusen verdickt. Diese Messungen könnten die Hypothese stützen, dass die transgenen Tiere eine verstärkte Hypertrophie aufweisen und durch die Überexpression von Fyco1 die Herzwände verdickt sind. Interessanterweise ist dieses Phänomen nur bei der Linie mit der höheren Fyco1-Expression (Linie F) darstellbar, sodass das Expressionsniveau für die Wandverdickung entscheidend sein könnte. Die übrigen Parameter, insbesondere das Fractional Shortening, waren statistisch nicht unterschiedlich. Die Ergebnisse werden in der Tabelle 3.1 dargestellt.

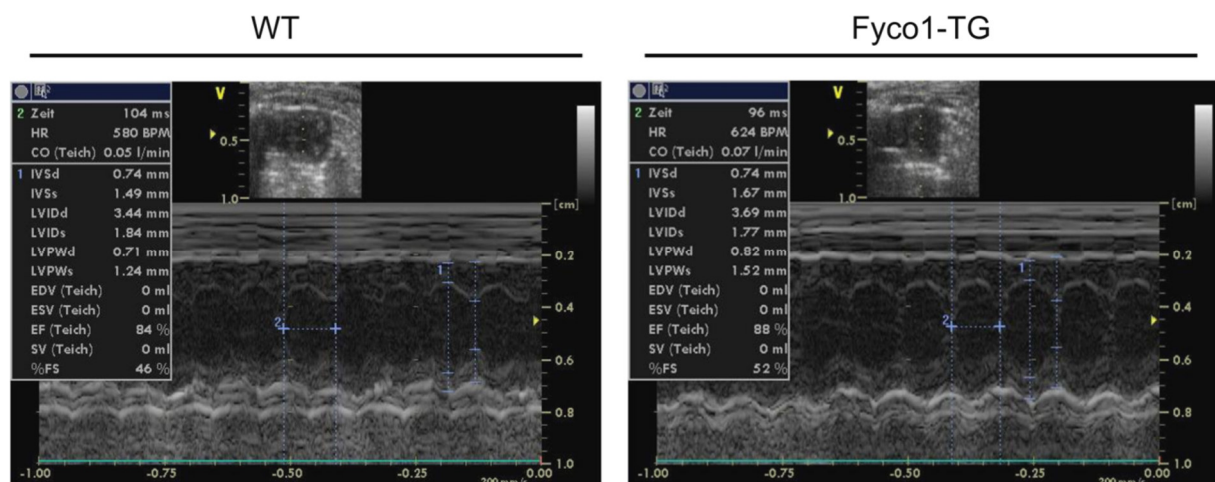


Abbildung 3-5: Echokardiographische Vermessung am Beispiel zweier Tiere aus Linie F.

Die Abbildung zeigt die Vermessung der Wandstärken und Diameter im M-Mode auf Papillarmuskelebene. Bei der Echokardiographie sind folgende Parameter für die Phänotypisierung von besonderem Interesse: IVSd = Interventricular septum in diastole [mm], IVSs = Interventricular septum in systole [mm], LVIDd = left ventricular internal diameter enddiastolic [mm], LVIDs = left ventricular internal diameter endsystolic [mm], LVPWd = Left Ventricular Posterior Wall in diastole [mm], LVPWs = Left Ventricular Posterior Wall in systole [mm], FS = Fractional Shortening [%].

Tabelle 3.1: Echokardiographie der Basischarakterisierung.

Linie	Genotyp	n	IVSd [mm]	LVIDd [mm]	LVPWd [mm]	IVSs [mm]	LVIDs [mm]	LVPWs [mm]	FS [%]
Linie A	WT	8	0,77 ± 0,02	3,81 ± 0,08	0,82 ± 0,04	1,35 ± 0,03	2,35 ± 0,10	1,36 ± 0,06	38,54 ± 1,87
	Fyco1-TG	9	0,73 ± 0,02	4,04 ± 0,07	0,78 ± 0,03	1,39 ± 0,05	2,50 ± 0,12	1,38 ± 0,04	38,63 ± 2,19
	p-Wert		0,105	0,046	0,435	0,310	0,371	0,777	0,976
Linie F	WT	10	0,77 ± 0,02	3,90 ± 0,11	0,73 ± 0,02	1,42 ± 0,05	2,31 ± 0,15	1,34 ± 0,03	41,07 ± 2,07
	Fyco1-TG	9	0,87 ± 0,04	3,64 ± 0,07	0,85 ± 0,02	1,57 ± 0,06	2,06 ± 0,12	1,47 ± 0,05	43,96 ± 2,30
	p-Wert		0,020	0,070	<0,001	0,066	0,141	0,029	0,205

Die Tabelle zeigt die echokardiographisch ermittelten Werte der Basischarakterisierung der Linien A und F im Alter von 12 Wochen. Eingetragen ist je Spalte der Mittelwert ± Standardfehler sowie der ermittelte p-Wert. WT = Wildtyp-Mäuse, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Mäuse. IVSd = Interventricular septum in diastole [mm], IVSs = Interventricular septum in systole [mm], LVIDd = left ventricular internal diameter enddiastolic [mm], LVIDs = left ventricular internal diameter endsystolic [mm], LVPWd = Left Ventricular Posterior Wall in diastole [mm], LVPWs = Left Ventricular Posterior Wall in systole [mm], FS = Fractional Shortening [%]. In Linie A zeigen die transgenen Tiere einen größeren linksventrikulären, enddiastolischen Innendurchmesser (LVIDd). In Linie F sind die Wandstärken des Septums in der Diastole (IVSd) sowie der linksventrikulären Hinterwand (LVPWd und LVPWs) bei den transgenen Tieren vergrößert.

3.1.4 Fyco1-transgene Mäuse entwickeln größere Kardiomyozyten

Zur histologischen Charakterisierung dient der Querschnitt des Herzens auf Papillarmuskelebene. Zur Übersicht wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) der Gewebeschnitte angefertigt (s. Kapitel 2.2.7.2). Zur Darstellung etwaiger fibrotischer Areale oder fibrotischer Umwandlung im Rahmen eines Remodelings wurde die Sirius Red/Fast Green Kollagenfärbung angefertigt, die kollagene Fasern rot und nicht-kollagene Proteine grün dargestellt (s. Kapitel 2.2.7.3). Beide Färbungen zeigen keinen Unterschied zwischen transgenen Tieren (Fyco1-TG) und Wildtypen (WT) (s. Abbildung 3-6).

Zur Darstellung der Sarkomerstruktur dient die immunologische Färbung mittels Antikörpern gegen α -Actinin (s. Kapitel 2.2.7.4 und Abbildung 3-7). Diese zeigte sowohl bei den Wildtypen, als auch bei den Fyco1-transgenen Mäusen einen regelrechten Aufbau.

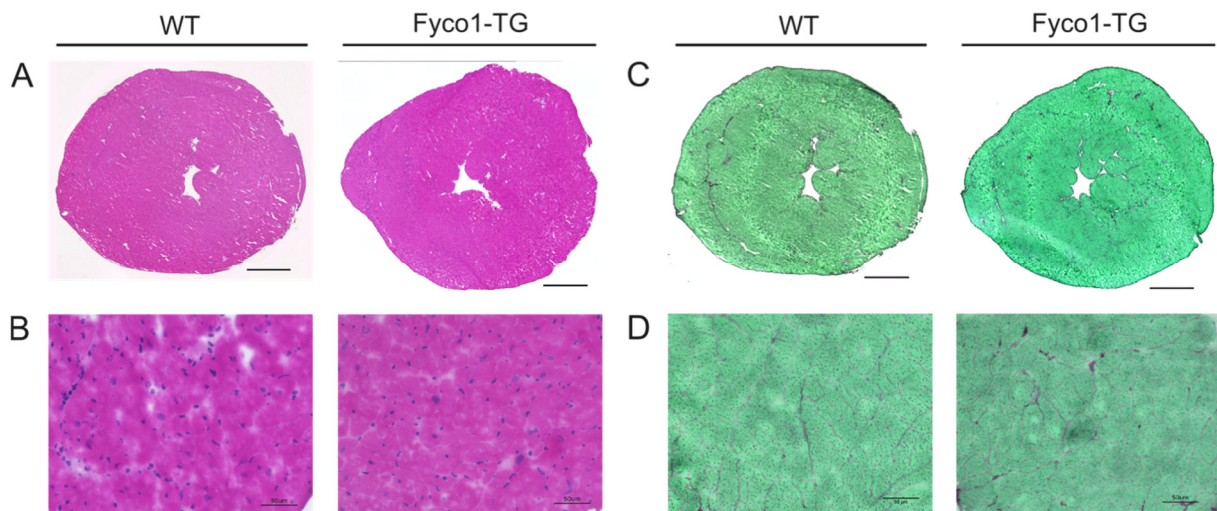


Abbildung 3-6: Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Sirius Red/Fast Green Kollagenfärbung am Beispiel der Linie F.

WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. **A.** Übersicht eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnittes auf Papillarmuskelebene für einen Wildtyp und ein transgenes Tier. Der Maßstab beträgt 1 mm. **B.** 40-fache Vergrößerung des H.E.-Schnittes im Papillarmuskel. Der Maßstab beträgt 50 μ m. **C.** Sirius Red/Fast Green Kollagenfärbung in der Übersicht. Der Maßstab beträgt 1 mm. **D.** 40-fache Vergrößerung des Schnittes aus C. im Papillarmuskel. Der Maßstab beträgt 50 μ m. Zwischen Wildtyp und transgenen Tieren gibt es keinen histomorphologischen Unterschied.

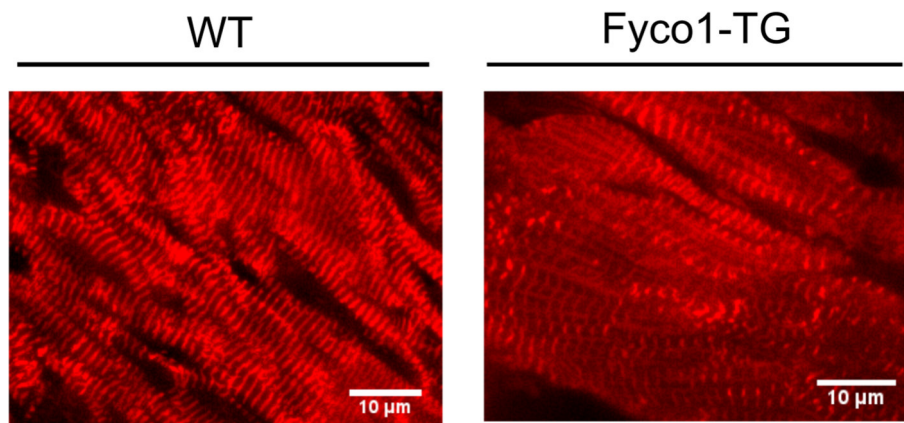


Abbildung 3-7: Immunhistochemische Darstellung des α -Actinin aus Linie F.

WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. Genutzt wurden α -Actinin-Antikörper zur Darstellung der Sarkomerstruktur in 60-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 10 μ m. Bei beiden Tieren stellt sich die Sarkomerstruktur regelrecht dar.

Mittels der FITC-konjugierten Lektin-Färbung (s. Kapitel 2.2.7.4) konnten die Zellmembranen sichtbar gemacht und die Aufnahmen zur Zellgrößenbestimmung genutzt werden. Am besten eignete sich der Anschnitt des Papillarmuskels, da dort der Faserverlauf senkrecht zur Schnittrichtung verläuft. Die Ergebnisse der Querschnittsflächen wurden statistisch ausgewertet. Dabei zeigten sich hochsignifikant größere Kardiomyozyten in den transgenen

Tieren beider Linien im Vergleich zu den Wildtypen ($p < 0,001$). Für Linie A wurden je Gruppe folgende Anzahl an Kardiomyozyten vermessen: WT ($n=550$) und Fyco1-TG ($n=547$) sowie für Linie F: WT ($n=499$) und Fyco1-TG ($n=526$). Doch auch der statistische Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Tiere ergab für Linie A um 18% ($p < 0,01$, $n=5$) und für Linie F um 24% ($p < 0,05$, $n=6$) signifikant größere Zellen in den Fyco1-TG Tieren verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (s. Abbildung 3-8).

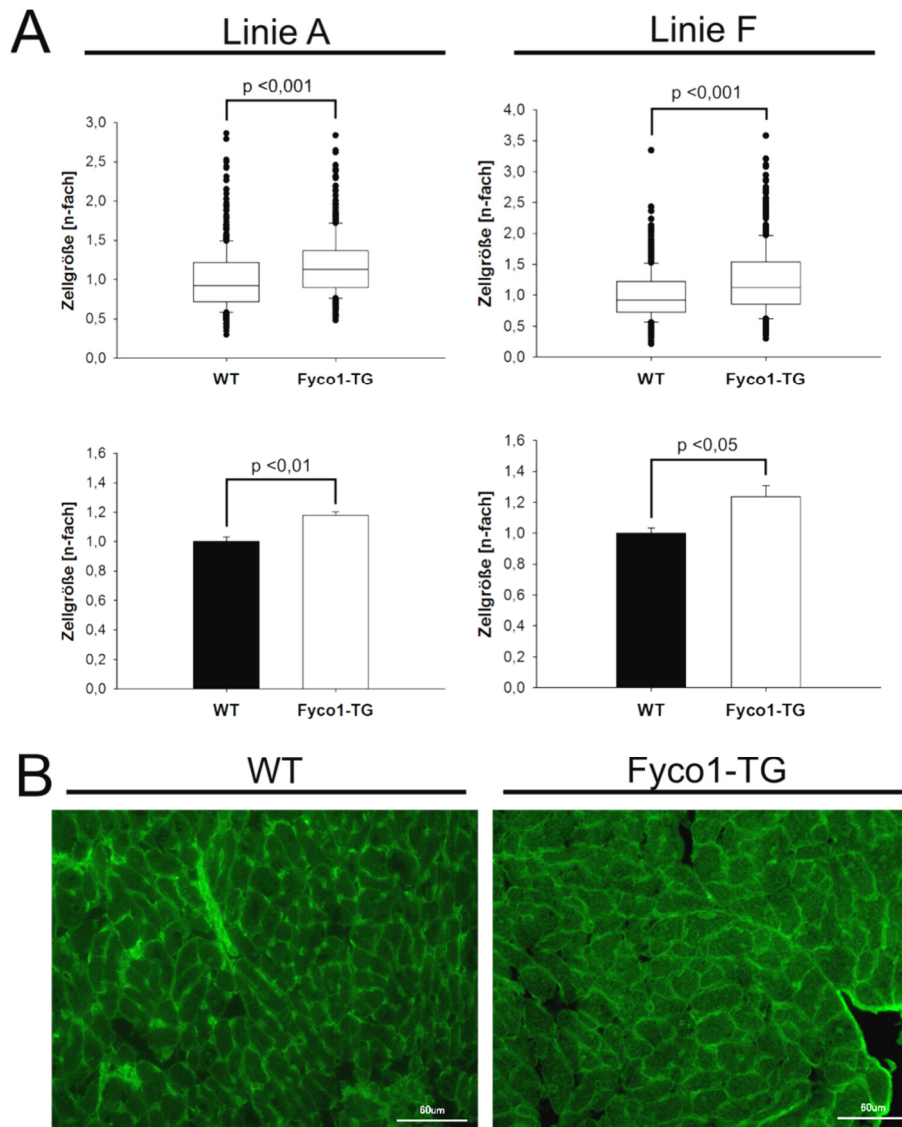


Abbildung 3-8: Zellgrößenbestimmung der Linie A und Linie F.

WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. **A.** Im Boxplot-Diagramm wurden die einzelnen Messwerte aller Kardiomyozyten miteinander verglichen, auf den Mittelwert der Wildtyp-Zellen normalisiert und graphisch aufgetragen. Dabei zeigen sich in beiden Linien hochsignifikant größere Zellen als bei den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$). Im Balkendiagramm sind die Mittelwerte der einzelnen Tiere ebenfalls auf den Mittelwert der Wildtyp-Mäuse normalisiert und miteinander verglichen worden. Dabei zeigt sich in der Linie A 1,18-fach ($p < 0,01$, $n=5$) sowie in der Linie F 1,24-fach ($p < 0,05$, $n=6$) größere Zellen der transgenen Tiere. **B.** Beispielhafte Lektin-Färbung der Linie F eines Wildtyps und einer transgenen Maus zur Darstellung der Zellmembranen in 40-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 60 μm .

3.1.5 Anzeichen einer erhöhten Expression des hypertrophen Genprogramms durch Fyco1-Überexpression

Die cDNA der Linie F wurde in einer Multiplex qRT-PCR zur Quantifizierung des sogenannten „hypertrophen Genprogramms“ (*Nppa*, *Nppb* und *RCAN1*) verwendet. *Nppa* kodiert für ANP (Atriales natriuretisches Peptid), *Nppb* für BNP (B-natriuretisches Peptid) und *RCAN1* für das Calcineurin A regulierende Protein. Im Rahmen der kardialen Hypertrophie sind diese Transkripte hochreguliert. Als endogene Kontrolle wurde das weitestgehend unregulierte *RPL32* verwendet. Die Expression des hypertrophen Genprogramms in unserem Experiment ergab dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtypen und den transgenen Mäusen. Unsere Messungen lassen zwar eine Tendenz zur Induktion erkennen. Diese erhalten jedoch keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-9 dargestellt.

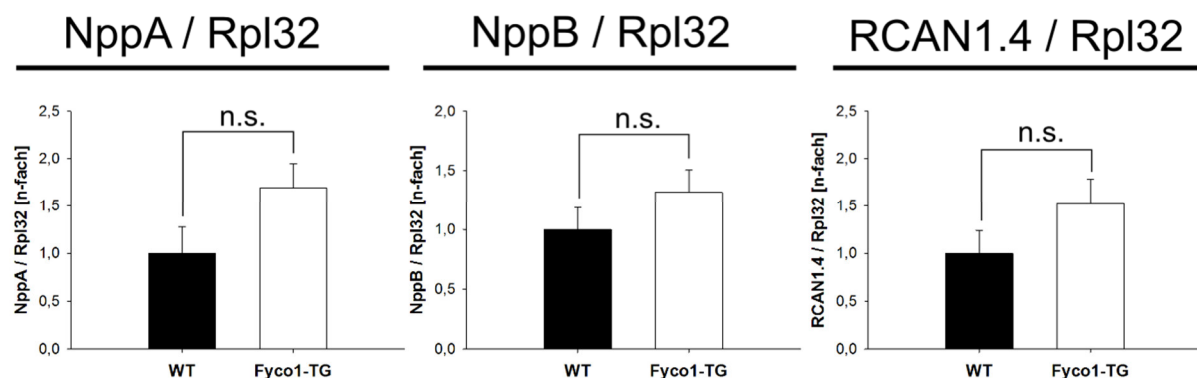


Abbildung 3-9: RNA-Expression der Linie F.

In einer Multiplex qRT-PCR wurde das sogenannte „hypertrophe Genprogramm“ gemessen. Die Expression der Zielgene wird sowohl auf das Referenzgen *RPL32* als auch auf die Vergleichsgruppe (WT) normalisiert, sodass die Zielgene in n-facher Expression zur Vergleichsgruppe gezeigt werden. *Nppa* = Natriuretic peptide precursor A, *Nppb* = Natriuretic peptide precursor B, *RCAN1* = regulator of calcineurin 1 isoform 4, *RPL32* = ribosomal protein L32. WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. Es gibt für die Expression des „hypertrophen Genprogramms“ keine signifikant unterschiedliche Expression in den Fyco1-TG Tieren der Linie F verglichen mit den Wildtyp-Geschwistertieren.

3.1.6 Die Überexpression von Fyco1 induziert die Autophagie

Ein Schlüsselprotein der Autophagie ist das LC3, da es in seiner mit PE konjugierten Form (LC3-II) in der Doppelmembran der Autophagosomen verankert ist. Die Menge an LC3-II korreliert dabei mit dem Ausmaß der Formation von Autophagosomen (Kabeya et al. 2000). Daher wurden die C57BL/6NCrl-Tg(Myh6-Fyco1)1Uhg Tiere der Linie F im Hintergrund der C57BL/6-Tg(CAG-EGFP/Map1lc3b)53Nmz Linie gezüchtet. Diese Linie überexprimiert LC3 mit einem GFP-Reporter, sodass die Autophagosomen fluoreszenzmikroskopisch dargestellt

werden kann (Mizushima et al. 2004). Dies wurde bei der histologischen Basischarakterisierung der Fyco1-TG x GFP-LC3-TG transgenen Tiere genutzt und mit den Fyco1-WT x GFP-LC3-TG Tieren verglichen. Durch Auszählen der GFP-positiven Strukturen konnten die Autophagosomen quantifiziert und mittels Färbung der Zellmembranen pro Zelle angegeben werden (s. Abbildung 3-10). Von jeweils drei Tieren wurden je drei bis vier Bildausschnitte ausgewertet und miteinander verglichen. Es wurde folgende Anzahl an Bildausschnitten je Gruppe ausgewertet: Fyco1-WT x GFP-LC3-TG (n=10) und Fyco1-TG x GFP-LC3-TG (n=9). Es zeigte sich in den Fyco1-transgenen Tieren eine durchschnittlich 51,4-fache Autophagosomen-Anzahl im Verhältnis zu der der Wildtyp-Mäuse ($p < 0,001$). Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3-11 dargestellt.

Freundlicherweise wurden von Prof. Dr. Lüllmann-Rauch aus dem Anatomischen Institut der CAU Kiel zudem auch elektronenmikroskopische Bilder der Papillarmuskeln von Wildtyp und transgenen Mäusen angefertigt. Während in den Aufnahmen der Wildtyp-Mäuse kaum Autophagosomen zu finden sind, sind diese in den Aufnahmen der transgenen Mäuse zahlreich und ultrastrukturell intakt zu finden (s. Abbildung 3-12).

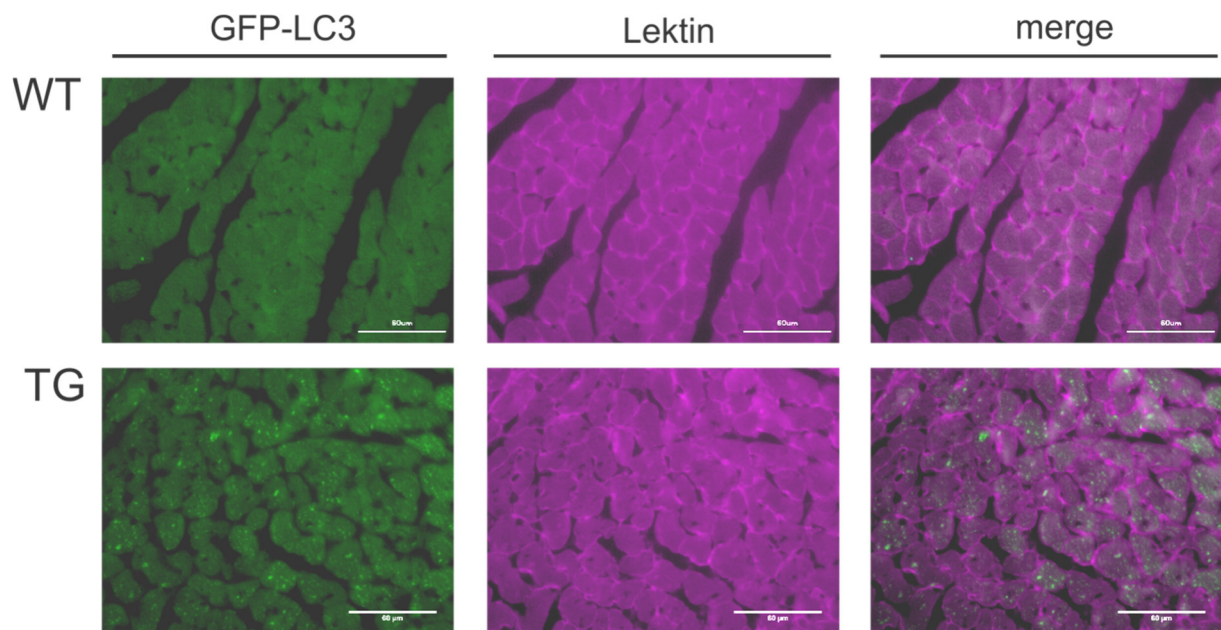


Abbildung 3-10: Darstellung des GFP-LC3 in der Basischarakterisierung.

Exemplarische Darstellung des fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen GFP-LC3 sowie der Zellmembranen (Lektin) einer Wildtyp- und einer Fyco1-transgenen Maus. Diese Bilder wurden zur besseren Veranschaulichung übereinandergelegt (merge). WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. Der Maßstab beträgt jeweils 60 µm. In den Fyco1-transgenen Tieren lassen sich deutlich mehr Autophagosomen/Zelle darstellen.

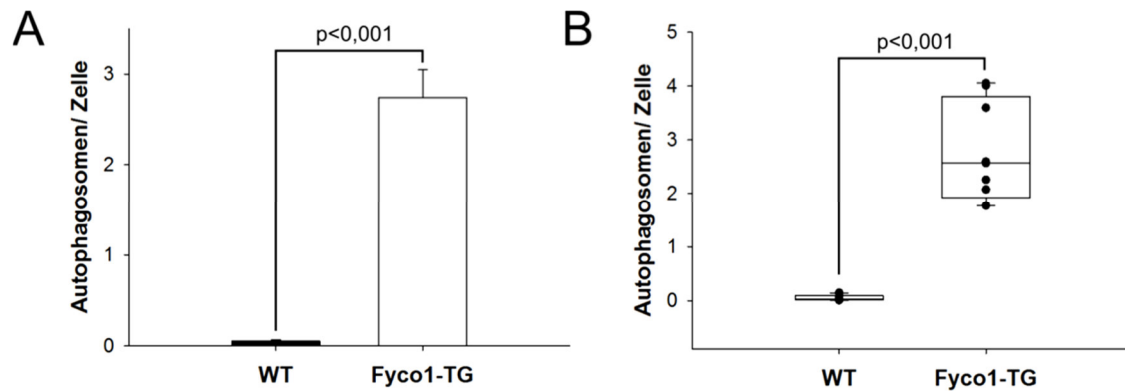


Abbildung 3-11: Quantifizierung der Autophagie nach immunologischer Darstellung des GFP-LC3.

Die Autophagie wird als Anzahl der detektierten GFP-positiven Autophagosomen pro Zelle angegeben. WT = Wildtyp-Maus, n=10; Fyco1-TG = transgene Maus, n=9. **A.** Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl der Autophagosomen/Zelle sowie den entsprechenden Standardfehler in Wildtypen und Fyco1-transgenen Tieren. Daraus ergeben sich für die Wildtyp-Maus: $0,053 \pm 0,016$ vs. transgene Maus: $2,74 \pm 0,305$ Autophagosomen pro Zelle. **B.** Im Boxplot-Diagramm werden die Mediane als Strich in der Box, das 25. Und 75. Perzentil als untere/ obere Begrenzung der Box, das 10. Und 90. Perzentil als Linien oberhalb und unterhalb der Box, als auch die einzelnen Messwerte als Punkte dargestellt. Die Fyco1-transgenen Tiere haben ein signifikant höheres Autophagie-Niveau ($p < 0,001$).

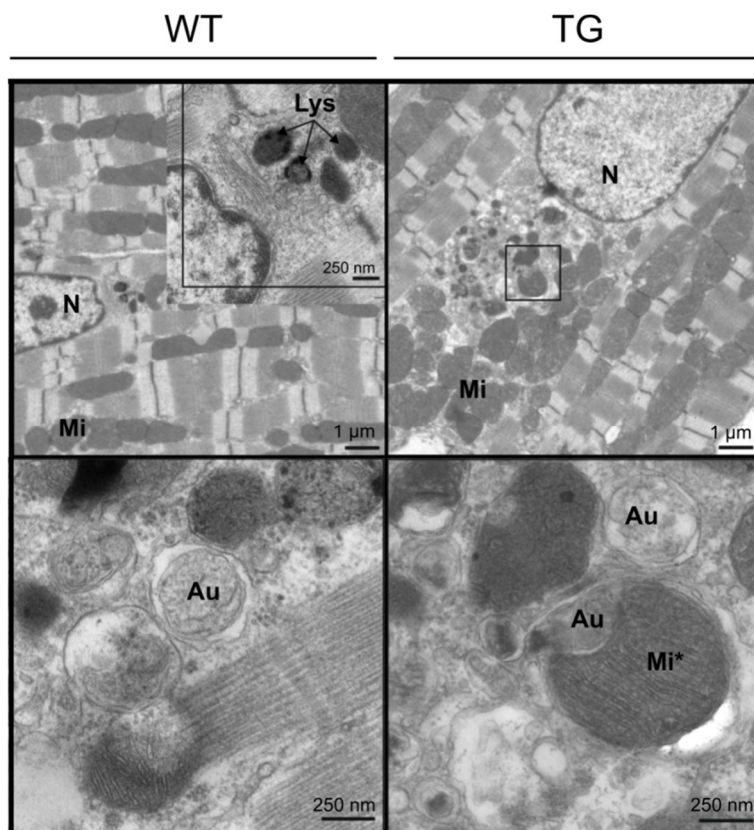


Abbildung 3-12: Bilder der Kardiomyozyten aus dem Papillarmuskel eines Fyco1-transgenen Tieres und einer Wildtyp-Maus unter dem Elektronenmikroskop.

Diese Bilder wurden von Prof. Dr. Lüllmann-Rauch aus dem Anatomischen Institut der CAU Kiel angefertigt.

Au = Autophagosom, **Lys** = Lysosom, **N** = Nukleus, **Mi** = Mitochondrium, **Mi*** = Mitochondrium in Autophagosom. Der Maßstab beträgt 1 µm bzw. 250 nm. In den Aufnahmen der Wildtyp-Mäuse sind kaum Autophagosomen zu finden. In den Aufnahmen der Fyco1-transgenen Tiere hingegen, finden sich zahlreiche, ultrastrukturell intakte Autophagosomen.

Im Western Blot wurde zur Quantifizierung der Autophagie der Quotient von LC3-II zu Tubulin verwendet. Auch hier zeigten sich in allen Versuchsreihen hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$). LC3-II/Tubulin war im Vergleich zu den Wildtypen in der Linie A 9,8-fach und in der Linie F 12,7-fach hochreguliert (s. Abbildung 3-13).

Des Weiteren ist auch das p62/SQSTM1 von Interesse. Zum einen, weil es selbst ein Substrat der Autophagie ist (Bjorkoy et al. 2005). Zum anderen weil es sowohl an LC3, als auch an Ubiquitin bindet und so eine Verbindung der zwei Degradationsmechanismen Autophagie und Proteasom-System herstellt (Pankiv et al. 2007). Im Western Blot für p62 zeigte sich eine Hochregulation bei den transgenen Tieren. In der Linie A betrug der auf den Mittelwert der Wildtypen normalisierte p62/Tubulin-Quotient durchschnittlich 2,9 ($p < 0,01$) und in der Linie F sogar 9,4 ($p < 0,001$) (s. Abbildung 3-13). Bei erhöhter Autophagie-Aktivität nimmt der Gehalt von p62 ab, während erhöhte p62-Werte unter niedriger Autophagie-Aktivität zu finden sind (Bjorkoy et al. 2009) (Tanida und Waguri 2010). Dies könnte bedeuten, dass in den transgenen Tieren zwar ein erhöhtes Autophagie-Niveau vorliegt, die Autophagie-Aktivität – auch als „Flux“ bezeichnet – in Form eines erhöhten Proteinumsatzes jedoch reduziert ist. Fyco1 könnte dazu beitragen, dass die Degradation der Autophagosomen nur reduziert möglich ist, weil es im Transport der Autophagosomen vermutlich eine Rolle spielt (s. Kapitel 1.4).

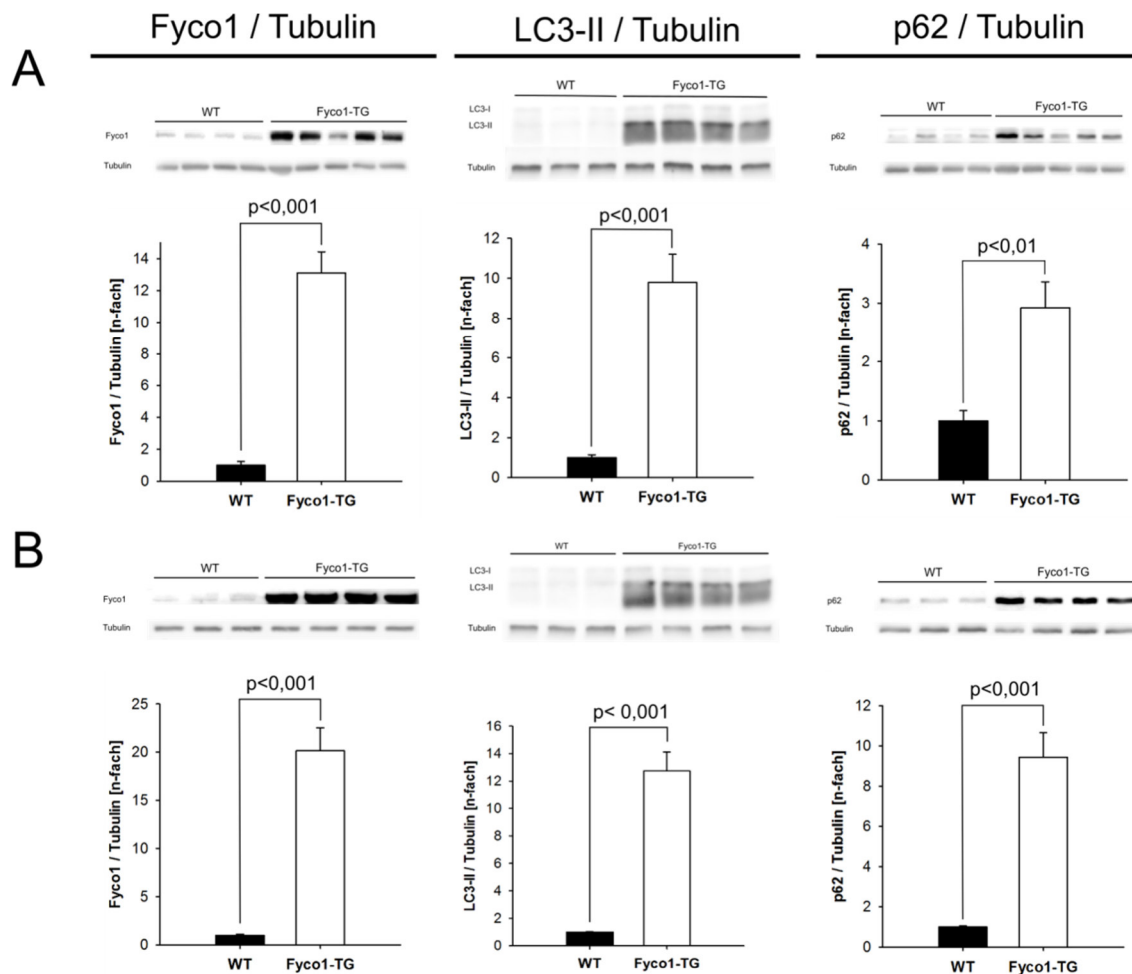


Abbildung 3-13: Proteinexpression im Herzen der Fyco1-TG Linien.

Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte zunächst als Normalisierung zu Tubulin als Ladekontrolle. Die daraus resultierenden Quotienten wurden durch den Mittelwert der Wildtypen geteilt, sodass die Expression in Relation zu den Wildtypen angegeben werden kann [n-fach]. WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. **A.** Linie A. WT (n=8), Fyco1-TG (n=9). Die Überexpression von Fyco1 im Western Blot beträgt 13,1 gegenüber den Wildtyp-Tieren ($p < 0.001$). Das Autophagie-Niveau wird im LC3-II-Blot als LC3-II/Tubulin angegeben und ist 9,8-fach hochreguliert. ($p < 0.001$). Der p62-Blot zeigt eine 2,9-fache Hochregulation ($p < 0.01$). **B.** Linie F. WT (n=10), Fyco1-TG (n=12). Ähnliche Ergebnisse ergeben sich in der Linie F. Fyco1 ist 20,1-fach überexprimiert ($p < 0.001$). Die Autophagie ist als Quotient von LC3-II/Tubulin um den Faktor 12,3 gegenüber den Wildtypen induziert ($p < 0.001$). p62 ist sogar 9,4-fach in den Fyco1-transgenen Tieren hochreguliert ($p < 0.001$).

3.2 Charakterisierung von einjährigen Fyco1-transgenen Tieren

Um der Frage nachgehen zu können, ob es zu einem aggravierten Phänotyp der Fyco1-TG Tiere im Alter kommt, wurden einige maskuline Tiere der Linie F im Alter von einem Jahr morphologisch und molekular charakterisiert.

3.2.1 Fyco1-transgene Mäuse zeigen auch im Alter schwerere Herzen

Vergleichbar zur Basischarakterisierung wurden das Körpergewicht, das Herz-, Lungen- und Lebergewicht sowie die Länge der rechten Tibia der männlichen Tiere gemessen. Das Herzgewicht wurde im Verhältnis zum Körpergewicht [mg/g] und zur Länge der Tibia [mg/mm] angegeben. Im Alter von einem Jahr zeigten die transgenen Tiere einen hochsignifikant größeren Quotienten aus Herzgewicht zu Tibialänge ($n=5$, $p<0,001$). Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht unterschied sich hingegen nicht (n.s.). Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass die gealterten, transgenen Tiere ein um durchschnittlich 2,58 g höheres, aber nicht signifikant unterschiedliches Körpergewicht aufwiesen, sodass die Quotienten von Herz- zu Körpergewicht statistisch nicht mehr voneinander abwichen. Das mittlere Körpergewicht der Wildtypen betrug $37,7 \text{ g} \pm 2,7 \text{ g}$ und das der transgenen Mäuse $40,2 \text{ g} \pm 2,4 \text{ g}$. Vergleicht man jedoch die absoluten Werte miteinander, so ergab sich für die Wildtyp-Mäuse ein durchschnittliches Herzgewicht von $136,6 \text{ mg} \pm 3,96 \text{ mg}$ und für die transgenen Tiere ein Mittelwert von $168,9 \text{ mg} \pm 3,19 \text{ mg}$. Die transgenen Tiere wiesen ein hochsignifikant schwereres Herz auf ($p<0,001$). Die Gewichte von Leber und Lunge unterschieden sich hingegen nicht voneinander (n.s.). Die Ergebnisse sind als Balkendiagramme in Abbildung 3-14 dargestellt. Insgesamt unterscheiden sich die Ergebnisse nicht von denen der Basischarakterisierung, sodass morphologisch kein aggravierter Phänotyp festgestellt werden kann.

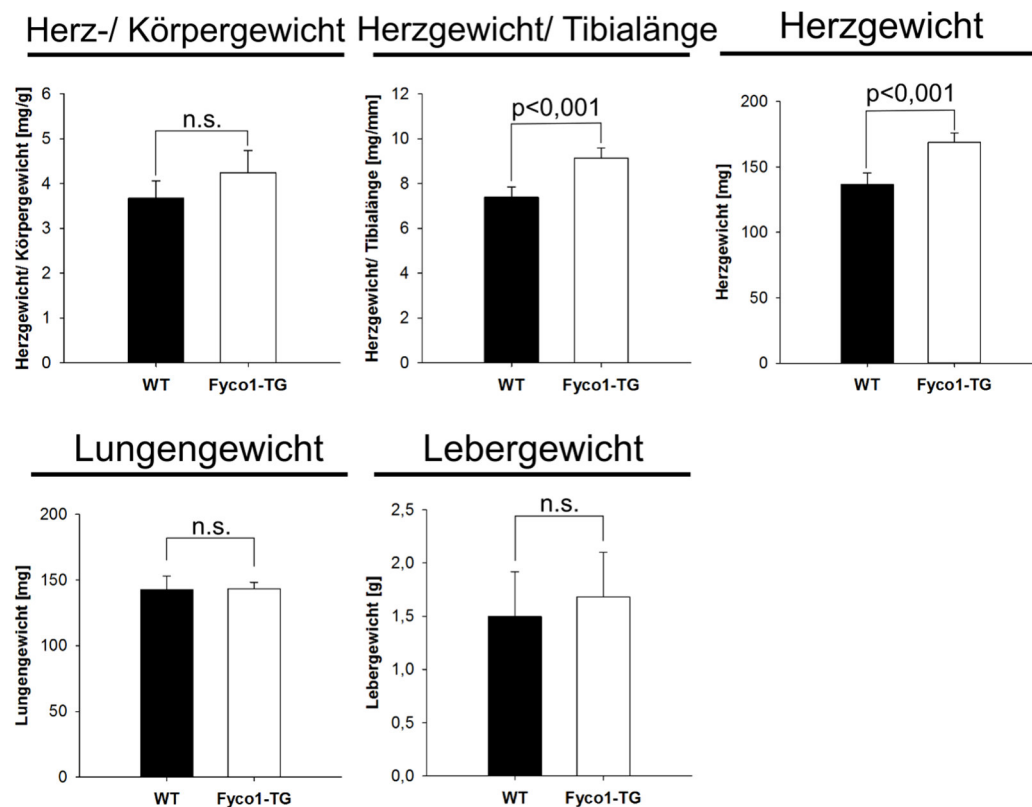


Abbildung 3-14: Morphologie der Linie F im Alter von einem Jahr.

WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus. Die Fyco1-TG haben einen hochsignifikant größeren Quotienten aus Herzgewicht/Tibiallänge [mg/mm] im Vergleich zu den Wildtypen ($p < 0,001$). Auch bei den absoluten Werten ist das Herzgewicht der transgenen Tiere signifikant höher als bei den Wildtypen ($p < 0,001$). Die schwereren Herzen könnten ähnlich wie in der Basischarakterisierung für eine kardiale Hypertrophie sprechen. Die übrigen Messwerte unterscheiden sich nicht (n.s.).

3.2.2 Echokardiographie der gealterten Tiere

Die Echokardiographie wurde wie in der Basischarakterisierung beschrieben durchgeführt. Die Auswertung ergab bei keinem der erhobenen Messwerte einen statistischen Unterschied zwischen den transgenen Tieren und ihren Wildtyp-Geschwistertieren ($p > 0,05$, $n=5$). Daraus ergibt sich echokardiographisch ebenfalls kein aggravierter Phänotyp der gealterten, Fyco1-transgenen Tiere.

Tabelle 3.2: Echokardiographie der gealterten Tiere.

[illegible]

Die Tabelle zeigt die echokardiographisch ermittelten Werte der ein Jahr gealterten Tiere der Linie F. Eingetragen ist je Spalte der Mittelwert \pm Standardfehler sowie der ermittelte p-Wert. WT = Wildtyp-Mäuse, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Mäuse. Statistisch zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei den Messungen zwischen den transgenen und den Wildtyp-Mäusen ($p > 0,05$).

3.2.3 Vergleichbare Autophagie-Induktion durch Fyco1 im Alter von einem Jahr

Die molekulare Charakterisierung erfolgte analog zur Basischarakterisierung. Dabei ergab sich im Western Blot für Fyco1 eine Überexpression von durchschnittlich 11,5-fach gegenüber den Wildtyp-Tieren ($p < 0,01$). Das Autophagie-Niveau, angegeben als Quotient aus LC3-II/Tubulin, ergab bei den einjährigen, transgenen Tieren eine siebenfache Hochregulation gegenüber den Wildtyp-Tieren ($p < 0,001$). Im Western Blot für p62 ergab sich eine achtfache Hochregulation der transgenen Tiere ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse entsprechen denen der Basischarakterisierung, sodass auch molekular kein aggravierter Phänotyp der Fyco1-transgenen Tiere feststellbar ist. Die entsprechenden Western Blots sowie die statistische Auswertung im Balkendiagramm sind in Abbildung 3-15 dargestellt.

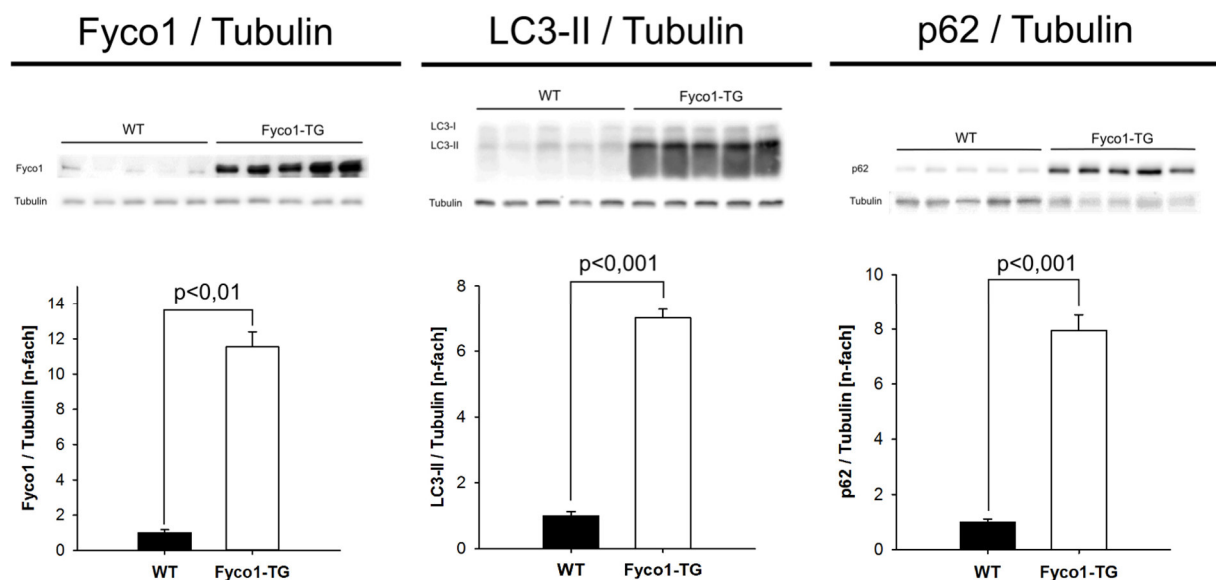


Abbildung 3-15: Proteinexpression der Linie F im Alter von einem Jahr.

Linie F, ein Jahr alt. Überexpression im Western Blot für Fyco1: 11,5-fach ($p < 0,001$), LC3-II-Blot: 7,0-fach ($p < 0,001$), p62-Blot: 8,0-fach ($p < 0,001$).

3.2.4 Kein Anstieg der Hypertrophie-Gene im Alter

Analog zur Basischarakterisierung erfolgte bei den Tieren der Linie F im Alter von einem Jahr die Analyse des „Hypertrophen Genprogramms“ mittels einer qRT-PCR. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der Gene *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1* in den

transgenen Mäusen gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistertieren ($p > 0,05$). Dieses Ergebnis entspricht dem der Basischarakterisierung. Die Messungen zeigen höhere Genexpressionen der hypertrophen Gene in den transgenen Tieren, die jedoch keine statistische Signifikanz aufweisen. Im Alter lässt sich dementsprechend kein aggravierter Phänotyp feststellen. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind im Balkendiagramm der Abbildung 3-16 dargestellt.

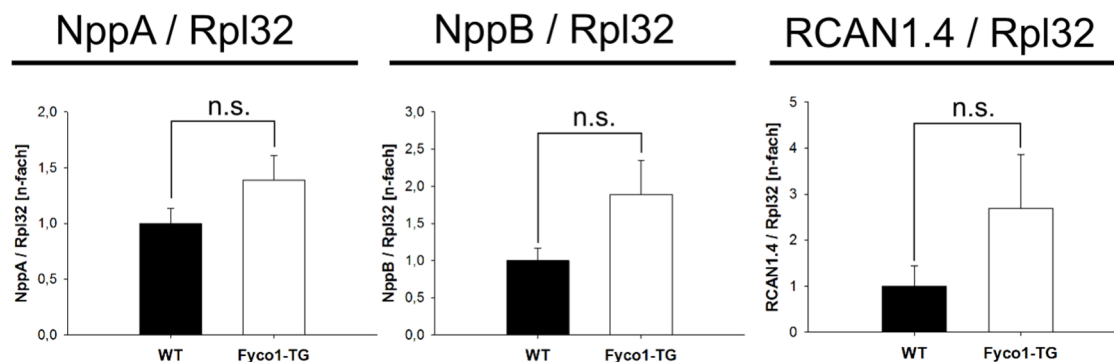


Abbildung 3-16: RNA-Expression der Fyco1-transgenen Tiere im Alter von einem Jahr.

Trotz höherer Expressionen von *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1* in den Fyco1-TG unterscheiden sich WT und Fyco1-TG statistisch nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).

3.3 Aortale Konstriktion der Fyco1-TG x GFP-LC3-TG Linie

Die aortale Konstriktion bzw. die Scheinoperation erfolgte im Alter von zehn Wochen und wurde von Dr. Kuhn aus der Klinik für Innere Medizin III des UKSH durchgeführt (s. Kapitel 2.2.6.3). Dafür wurden die doppelt transgenen Tiere der Fyco1-TG x GFP-LC3-TG Linie aus Kapitel 3.1.6 verwendet und mit den Fyco1-WT x GFP-LC3-TG Tieren verglichen. 14 Tage nach der Operation wurden die Tiere von Dr. Kuhn echokardiographisch vermessen, anschließend gewogen und ihre Organe entnommen. Aus diesem Versuchsvorhaben resultierten vier Gruppen, die statistisch miteinander verglichen wurden: WT Sham, TG Sham, WT TAC und TG TAC.

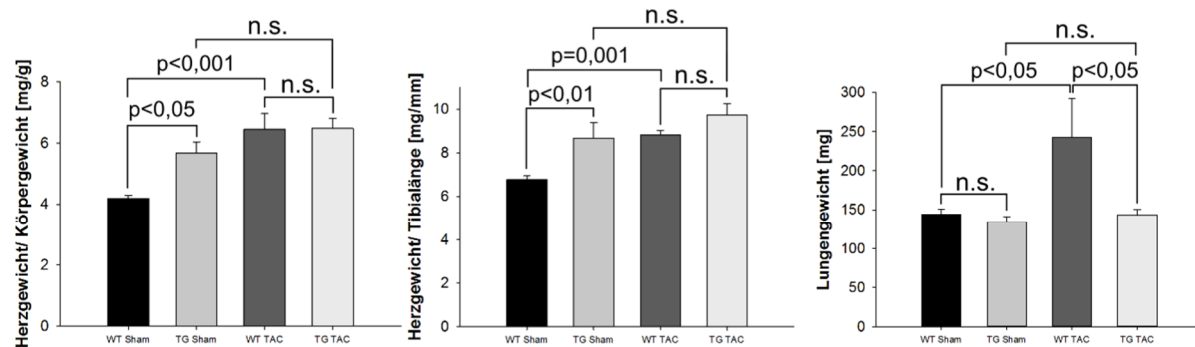
3.3.1 Morphologischer Phänotyp nach aortaler Konstriktion

Die morphologische Charakterisierung umfasste das Körpergewicht [g], das Herzgewicht [mg], das Gewicht des linken Ventrikels (LV-Gewicht) [mg], das Lungengewicht [mg] sowie die Länge der rechten Tibia [mm]. Das Gewicht des linken Ventrikels wurde hinzugenommen, um vor allem die linksventrikuläre Hypertrophie besser beurteilen zu können. Um eine linksventrikuläre Insuffizienz aufgrund der Nachlasterrhöhung nach TAC morphologisch beschreiben zu können, wurde das Lungengewicht als Parameter eines möglichen Lungenödems herangezogen. Das Herz- bzw. LV-Gewicht wurde im Verhältnis zum Körpergewicht [mg/g] bzw. der Tibialänge [mg/mm] angegeben.

Vergleicht man die scheinoperierten Tiere miteinander, so zeigten die Fyco1-transgenen Tiere schwerere Herzen und linke Ventrikel bezogen aufs Körpergewicht oder die Tibiallänge ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Basischarakterisierung (s. Kapitel 3.1.2).

Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich erwartungsgemäß nach aortaler Konstriktion ein hochsignifikant größeres Verhältnis von Herz- bzw. LV-Gewicht zum Körpergewicht verglichen mit den scheinoperierten Wildtypen ($p < 0,001$), da sich der linke Ventrikel an die chronische Nachlasterhöhung mit der Entwicklung einer Hypertrophie adaptiert. Ähnlich, jedoch weniger signifikant, verhielt es sich mit den Verhältnissen zur Tibiallänge: Herzgewicht/Tibiallänge ($p < 0,01$) und LV-Gewicht/Tibiallänge ($p < 0,05$). Interessanterweise konnte nach aortaler Konstriktion in den transgenen Tieren kein Unterschied der Herz- und LV-Gewichte zu Körpergewicht oder Tibiallänge verglichen mit den scheinoperierten, transgenen Tieren festgestellt werden (n.s.). Ebenso zeigte sich kein Unterschied in den Verhältnissen zwischen Wildtyp-Mäusen oder transgenen Mäusen nach aortaler Konstriktion (n.s.). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die transgenen Tiere durch die Überexpression von Fyco1 bei chronischer Nachlasterhöhung durch TAC deutlich weniger eine kardiale Hypertrophie entwickeln als die Wildtyp-Mäuse. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Lungengewichte: Die Wildtyp-Mäuse hatten nach aortaler Konstriktion signifikant schwerere Lungen als die transgenen Tiere nach TAC ($p < 0,05$). Letztere zeigten keinen Unterschied im Lungengewicht zwischen Scheinoperation oder TAC (n.s.). Dies könnte für ein Lungenödem der Wildtyp-Mäuse aufgrund einer Linksherzinsuffizienz nach TAC sprechen, die die transgenen Tiere aufgrund der Fyco1-Überexpression nicht entwickeln. Die genaue Ursache bleibt jedoch unklar. Die Ergebnisse sind im Balkendiagramm graphisch dargestellt (s. Abbildung 3-17).

Herz-/Körpergewicht Herzgewicht/ Tibiallänge Lungengewicht



LV-/Körpergewicht LV-Gewicht/ Tibiallänge

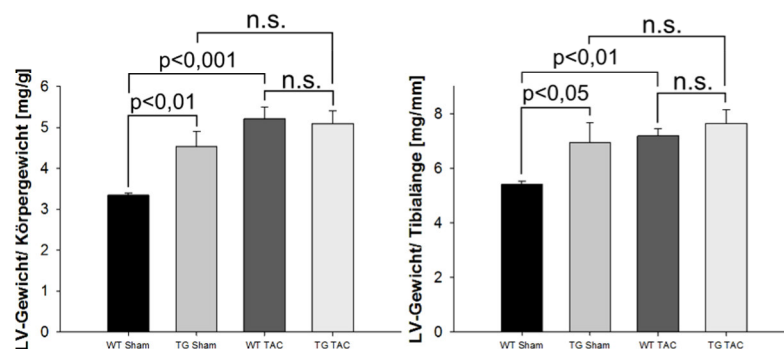


Abbildung 3-17: Morphologie der Tiere nach Scheinoperation oder aortaler Konstriktion.

Die Balkendiagramme zeigen den morphologischen Phänotyp ausgedrückt als Herz-/Körpergewicht [mg/g], Herzgewicht/Tibiallänge [mg/mm], Lungengewicht [mg], LV-Gewicht/Körpergewicht [mg/g] und LV-Gewicht/Tibiallänge [mg/mm] des Versuchs der aortalen Konstriktion. WT = Wildtyp-Maus, TG = Fyco1 transgene Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. Von links nach rechts wird folgende Reihenfolge angegeben: WT Sham (schwarz), TG Sham (grau), WT TAC (dunkelgrau), TG TAC (hellgrau). Bei der Morphologie der Wildtypen zeigt sich nach aortaler Konstriktion eine Zunahme des Herz- und LV-Gewichtes bezogen auf das Körpergewicht oder auf die Tibiallänge, aufgrund der kardialen Hypertrophie bei chronischer Nachlasterhöhung. Bei den scheineroperierten Tieren haben die transgenen Tiere ein erhöhtes Herz- bzw. LV-Gewicht, was bereits in der Basischarakterisierung beschrieben wurde. Die Lungengewichte unterscheiden sich ebenfalls statistisch voneinander: Nach TAC haben die Wildtyp-Mäuse schwerere Lungen als die transgenen Tiere nach aortaler Konstriktion ($242,4 \text{ mg} \pm 50,12 \text{ mg}$ vs. $143,84 \text{ mg} \pm 6,37 \text{ mg}$).

3.3.2 Die Fyco1-Überexpression führt zu vergrößerten Herzen

Die Querschnitte des Herzens auf Höhe der Papillarmuskeln wurden zur Übersicht mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) (s. Kapitel 2.2.7.2) und immunologisch mit Antikörpern gegen α -actinin s. Kapitel 2.2.7.4) gefärbt. In der Übersichtsfärbung zeigten sich vergrößerte Herzen der Wildtypen nach TAC, während hingegen die Herzen der transgenen Tiere keine Größenzunahme im Vergleich zu den scheineroperierten, transgenen Tieren

verzeichneten (s. Abbildung 3-18). Die Sarkomerstruktur zeigte sich in allen Gruppen regelrecht (s. Abbildung 3-19).

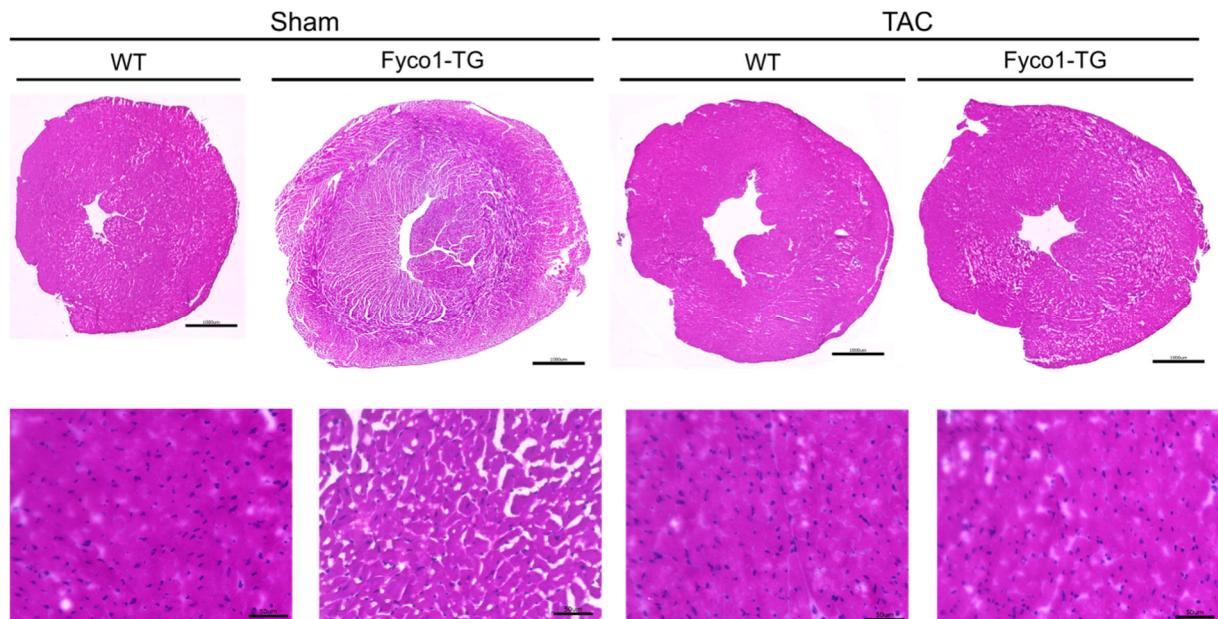


Abbildung 3-18: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Herzen mit und ohne aortale Konstriktion.

WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. Übersicht eines Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnittes auf Papillarmuskelebene für einen Wildtyp und ein transgenes Tier. Der Maßstab beträgt 1 mm. Ausschnitt der Hämatoxylin-Eosin-Färbung im Papillarmuskel bei 40-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 50 µm.

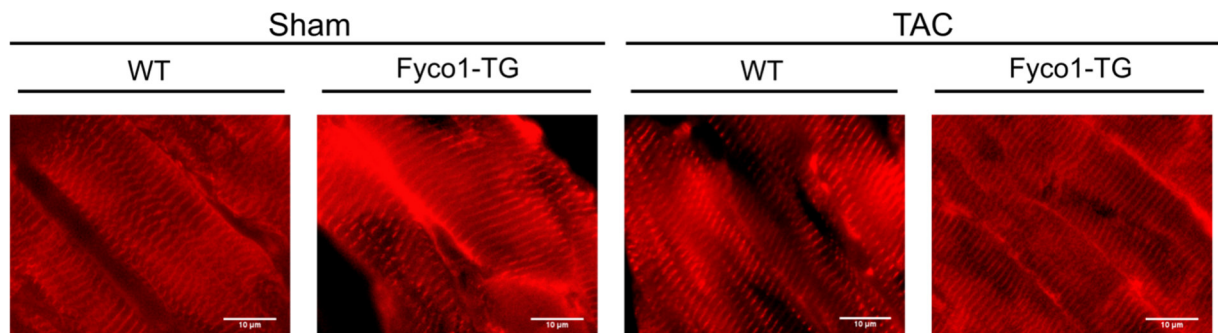


Abbildung 3-19: Darstellung der Sarkomerstruktur mit und ohne aortale Konstriktion.

WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. Actinin-Färbung zur Darstellung der Sarkomerstruktur in 60-facher Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 10 µm. Bei allen Tieren stellt sich die Sarkomerstruktur regelrecht dar.

3.3.3 Verbesserte Herzleistung durch Fyco1-Überexpression

Vor der Organentnahme wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert und von Dr. Kuhn aus der Klinik für Innere Medizin III transthorakal geschallt (s. Kapitel 2.2.6.2). Insgesamt wurden je Tier mehrere Vermessungen vorgenommen und der Mittelwert dieser pro Tier verwendet.

Diese Mittelwerte wurden zwischen den Gruppen verglichen und statistisch ausgewertet. Dabei wurde die Gruppen WT Sham mit Fyco1-TG Sham, WT Sham mit WT TAC und Fyco1-TG Sham mit Fyco1-TG TAC verglichen. Es waren folgende Parameter für die Phänotypisierung von besonderem Interesse:

1. Funktionell das Fractional Shortening (FS, fraktionelle Verkürzung) im M-Mode der kurzen Achse (SAX = parasternal short axis), die Ejektionsfraktion (EF) im B-Mode der langen Achse (PSLAX = parasternal long axis) sowie das E/A-Verhältnis, gemessen über der Mitralklappe im PW-Doppler. Je größer das E/A-Verhältnis ist, desto eher liegt eine diastolische Dysfunktion des Herzens vor. Die ermittelten Werte können der Tabelle 3.3 entnommen werden.
2. Die Volumina des linken Ventrikels am Ende der Diastole (d) und Systole (s) im B-Mode der langen parasternalen Achse (s. Tabelle 3.4).
3. Die linksventrikulären Diameter in der Diastole (d) und Systole (s) gemessen im M-Mode der kurzen (SAX) und langen parasternalen Achse (PSLAX) (s. Tabelle 3.5).

Es zeigte sich eine signifikante Verschlechterung des Fractional Shortening und der Ejektionsfraktion nach aortaler Konstriktion in den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,05$). Diese Verschlechterung war jedoch nicht in den transgenen Tieren nach TAC zu verzeichnen (s. Tabelle 3.3). Die Überexpression von Fyco1 in den transgenen Tieren resultiert bei chronischer Nachlasterrhöhung durch TAC also in einer den Wildtypen gegenüber verbesserten Herzfunktion. Auch enddiastolisch zeigten die Wildtyp-Mäuse nach TAC ein größeres LV-Volumen im Vergleich zu den transgenen Tieren nach TAC ($p < 0,05$). Es zeigte sich sowohl in den WT-Mäusen ($p < 0,05$), als auch in den transgenen Tieren nach TAC ein größeres E/A-Verhältnis als Hinweis auf eine diastolische Dysfunktion (s. Tabelle 3.4). In den Diametern des linken Ventrikels ließ sich hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellen (s. Tabelle 3.5). Die wichtigsten Parameter (FS, EF, LV-Volumen diastolisch und systolisch) sind im Balkendiagramm in Abbildung 3-20 dargestellt.

Tabelle 3.3: Funktionelle Parameter der Echokardiographie mit und ohne aortale Konstriktion.

Operation	Genotyp	n	FS [%]		EF [%]		n	E/A-Verhältnis
Sham	WT	8	36,39		49,71		8	1,89
			$\pm 4,91$		$\pm 2,49$			$\pm 0,15$
	Fyco1-TG	6	32,81	$p^* = 0,511$	45,65	$p^* = 0,425$	6	1,83
			$\pm 3,24$		$\pm 3,21$			$\pm 0,19$
TAC	WT	9	25,62	$p^\dagger = 0,035$	37,88	$p^\dagger = 0,014$	6	4,15
			$\pm 3,00$		$\pm 3,83$			$\pm 1,14$
	Fyco1-TG	8	31,50	$p^\dagger = 0,809$	45,44	$p^\dagger = 0,967$	8	4,89
			$\pm 2,52$		$\pm 3,30$			$\pm 0,65$

Die Tabelle zeigt die echokardiographisch ermittelten Werte der Fyco1-TG x GFP-LC3-TG Tiere nach Sham bzw. TAC Operation. Eingetragen ist je Spalte der Mittelwert \pm Standardfehler sowie der ermittelte p-Wert. WT = Wildtyp-Mäuse, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Mäuse. p*: WT Sham vs. Fyco1-TG Sham, p[†]: WT Sham vs. WT TAC, p[‡]: Fyco1-TG Sham vs. Fyco1-TG TAC. Statistisch zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Fractional Shortening sowie der Ejektionsfraktionen: Die Wildtyp-Mäuse zeigen nach aortaler Konstriktion ein signifikant verschlechtertes FS (p[†]=0,024) und eine geringere EF (p[†]=0,014). Im E/A-Verhältnis resultiert die aortale Konstriktion der Wildtyp-Mäuse in einem signifikant höherem Quotienten im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (p[†]=0,018). Dieser Effekt stellt sich in den transgenen Tieren ebenfalls dar.

Tabelle 3.4: Echokardiographisch ermittelte Volumina des linken Ventrikels mit und ohne aortale Konstriktion.

Operation	Genotyp	n	LV-Volumen; d [μl]		LV-Volumen; s [μl]	
Sham	WT	8	66,62 ±3,96		33,79 ±2,93	
	Fyco1-TG	6	59,63 ±2,72	p*=0,427	32,73 ±3,23	p*=0,882
TAC	WT	9	77,17 ±8,60	p [†] =0,187	48,10 ±6,75	p [†] =0,032
	Fyco1-TG	8	60,72 ±2,98	p [‡] =0,901	33,43 ±3,03	p [‡] =0,922

Die Tabelle zeigt die echokardiographisch ermittelten linksventrikulären Volumina nach Sham bzw. TAC Operation. Eingetragen ist je Spalte der Mittelwert \pm Standardfehler sowie der ermittelte p-Wert. WT = Wildtyp-Mäuse, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Mäuse. p*: WT Sham vs. Fyco1-TG Sham, p[†]: WT Sham vs. WT TAC, p[‡]: Fyco1-TG Sham vs. Fyco1-TG TAC. Nach aortaler Konstriktion zeigen die Wildtyp-Mäuse ein vergrößertes, enddiastolisches und endsystolisches LV-Volumen im Vergleich zu den transgenen Tieren nach TAC (p[†]=0,044 und p[†]=0,028). Das endsystolische LV-Volumen der WT-Mäuse ist auch im Vergleich zu den scheinoperierten Wildtypen vergrößert (p[†]=0,032).

Tabelle 3.5: Echokardiographisch ermittelte Durchmesser des linken Ventrikels mit und ohne aortale Konstriktion.

Operation	Genotyp	n	Diameter; d (PSLAX) [mm]		Diameter; s (PSLAX) [mm]		Diameter; d (SAX) [mm]		Diameter; s (SAX) [mm]	
Sham	WT	8	4,07 ±0,15		2,82 ±0,17		3,95 ±0,12		2,55 ±0,25	
	Fyco1-TG	6	3,79 ±0,12	p*=0,348	2,71 ±0,13	p*=0,728	3,66 ±0,17	p*=0,425	2,48 ±0,23	p*=0,864
TAC	WT	9	4,25 ±0,24	p [†] =0,481	3,28 ±0,26	p [†] =0,101	4,16 ±0,35	p [†] =0,533	3,12 ±0,32	p [†] =0,109
	Fyco1-TG	8	4,05 ±0,20	p [‡] =0,381	2,93 ±0,17	p [‡] =0,473	3,97 ±0,18	p [‡] =0,404	2,72 ±0,15	p [‡] =0,544

Die Tabelle zeigt die echokardiographisch ermittelten Durchmesser des linken Ventrikels nach Sham bzw. TAC Operation. Eingetragen ist je Spalte der Mittelwert \pm Standardfehler sowie der ermittelte p-Wert. WT = Wildtyp-Mäuse, Fyco1-TG = Fyco1 transgene Mäuse. p*: WT Sham vs. Fyco1-TG Sham, p[†]: WT Sham vs. WT TAC, p[‡]: Fyco1-TG Sham vs. Fyco1-TG TAC. Statistisch ergibt sich kein signifikanter Unterschied der Diameter des linken Ventrikels zwischen den einzelnen Gruppen.

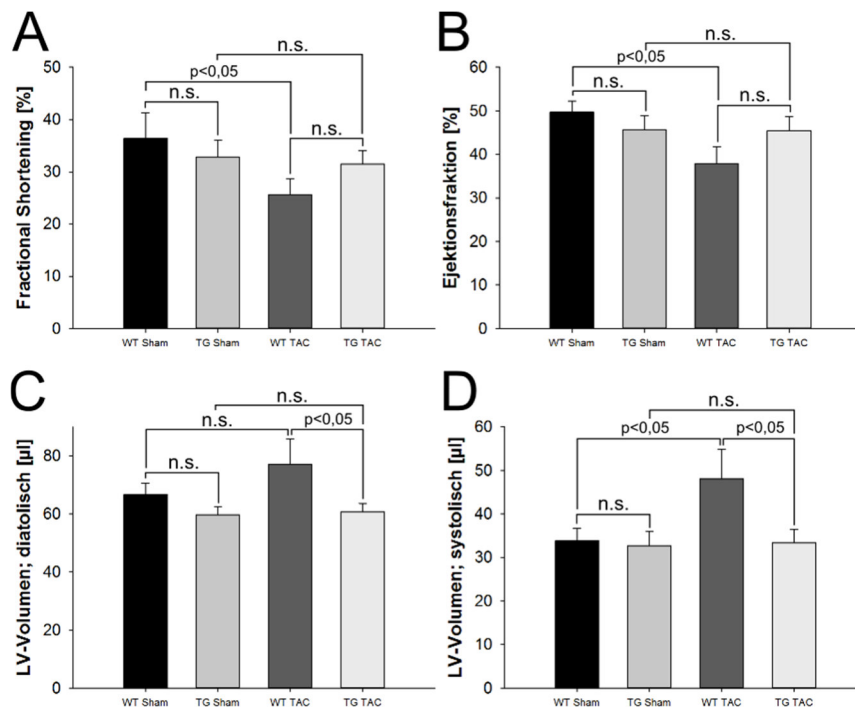


Abbildung 3-20: Wichtige echokardiographisch ermittelte Parameter im Balkendiagramm.

WT = Wildtyp-Maus, TG = Fyco1 transgene Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. Von links nach rechts wird folgende Reihenfolge angegeben: WT Sham (schwarz), TG Sham (grau), WT TAC (dunkelgrau), TG TAC (hellgrau). **A.** Darstellung des FS. Die WT TAC zeigen ein signifikant schlechteres FS im Vergleich zu WT Sham ($p < 0,05$). Dieser Effekt lässt sich zwischen TG Sham und TG TAC nicht zeigen (n.s.). **B.** Darstellung der EF. Auch hier zeigen die WT TAC eine Verschlechterung gegenüber den WT Sham ($p < 0,05$), die in den transgenen Tieren nicht zu verzeichnen ist (n.s.). **C.** Darstellung des enddiastolischen LV-Volumens. Im Vergleich zu den TG TAC, zeigen die WT TAC ein signifikant erhöhtes enddiastolisches LV-Volumen ($p < 0,05$). Die transgenen Tiere zeigen ein vergleichbares enddiastolisches LV-Volumen nach Scheinoperation bzw. TAC (n.s.). **D.** Darstellung des endsystolischen LV-Volumens. Dieser Effekt ist endsystolisch noch stärker ausgeprägt. Die WT TAC haben ein erhöhtes endsystolisches LV-Volumen gegenüber WT Sham ($p < 0,05$) und TG TAC ($p < 0,05$). Innerhalb der transgenen Tiere lässt sich von TG Sham und TG TAC kein Unterschied feststellen (n.s.).

3.3.4 Die Expression der Hypertrophie-Gene ist nach aortaler Konstriktion bei der Fyco1-Überexpression nicht verstärkt

Die kardiale cDNA der operierten Tiere wurde in einer Multiplex qRT-PCR zur Quantifizierung des sogenannten „hypertrophen Genprogramms“ verwendet. Es beinhaltet die Gene *Nppa* = Natriuretic peptide precursor A, *Nppb* = Natriuretic peptide precursor B und *Myh7* = Myosin heavy chain 7. *Nppa* kodiert für ANP (Atriales natriuretisches Peptid), *Nppb* für BNP (B-natriuretisches Peptid) und *Myh7* für das β MHC (myosin heavy chain beta). Als endogene Kontrolle wurde das weitestgehend unregulierte *RPL32* (ribosomal protein L32) verwendet. Es zeigte sich in den Wildtyp-Tieren der erwartete, signifikante Anstieg der Hypertrophie-Marker nach aortaler Konstriktion im Vergleich zu den scheinooperierten Wildtyp-

Mäusen. *Nppa* war 7,8-fach, *Nppb* 3,6-fach und *Myh7* sogar 14,8-fach hochreguliert. Durch die Nachlasterhöhung der aortalen Konstriktion wurde also die kardiale Hypertrophie stimuliert. Interessanterweise ergab sich bei den transgenen Tieren hingegen kein signifikanter Unterschied der Hypertrophie-Marker nach aortaler Konstriktion im Vergleich zu den scheinoperierten, transgenen Tieren. Die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie blieb im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren durch die Überexpression von *Fyco1* aus. Bei den scheinoperierten Tieren ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Expression der Hypertrophie-Gene zwischen den Wildtyp- und den transgenen Mäusen. Dieses Ergebnis ist mit dem der Basischarakterisierung der Linie F vergleichbar. In der Abbildung 3-21 sind die RNA-Expressionen der Hypertrophie-Gene als Balkendiagramme dargestellt.

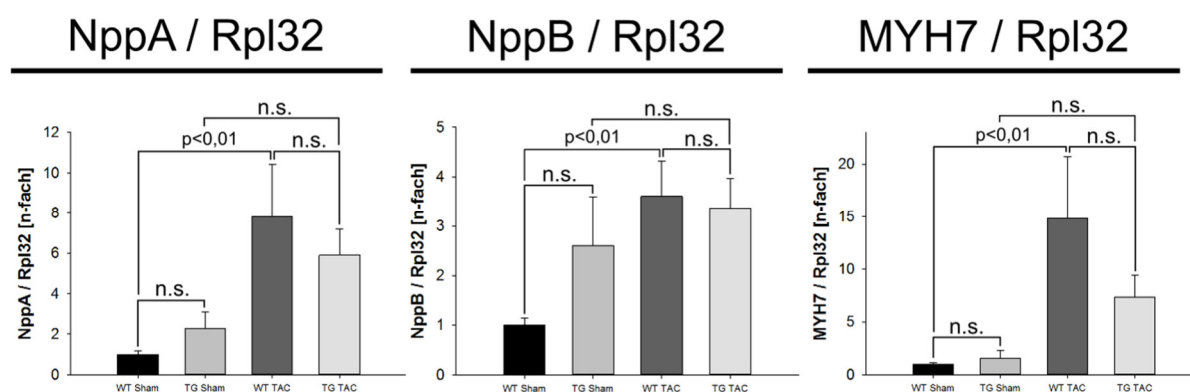


Abbildung 3-21: RNA-Expression der Herzen mit und ohne aortale Konstriktion.

In einer Multiplex qRT-PCR wurde das sogenannte "hypertrophe Genprogramm" gemessen. Die Expression der Zielgene wird mit *RPL32* ins Verhältnis gesetzt und bei der Vergleichsgruppe (WT) gleich 1 gesetzt, sodass die Zielgene in n-facher Expression zur Vergleichsgruppe gezeigt werden. *Nppa* = Natriuretic peptide precursor A, *Nppb* = Natriuretic peptide precursor B, *Myh7* = myosin heavy chain 7, *RPL32* = ribosomal protein L32. WT = Wildtyp-Maus, *Fyco1*-TG = transgene Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. Von links nach rechts wird folgende Reihenfolge angegeben: WT Sham (schwarz), TG Sham (grau), WT TAC (dunkelgrau), TG TAC (hellgrau). *Nppa* ist in den WT TAC 7,8-fach \pm 2,6 gegenüber den WT Sham hochreguliert (p < 0,01). Bei *Nppb* 3,6-fach \pm 0,7 und für *MYH7* 14,8-fach \pm 5,9. Durch die Nachlasterhöhung wurde die kardiale Hypertrophie stimuliert. Diese Stimulation bleibt in den transgenen Tieren nach aortaler Konstriktion gegenüber den scheinoperierten Tieren aus (TG TAC vs. TG Sham, p > 0,05). Die Überexpression von *Fyco1* vermindert die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bei Nachlasterhöhung.

3.3.5 Die *Fyco1*-transgenen Tiere exprimieren weniger β MHC nach aortaler Konstriktion

Zur Quantifizierung der Proteinexpressionen wurden Western Blots aus dem Herzgewebe der (schein-)operierten Tiere angefertigt (s. Kapitel 2.2.5.2 bis 2.2.5.6). In Abbildung 3-22 und werden für folgende Proteine die entsprechenden Western Blots dargestellt: LC3, p62 sowie Rab7. Abbildung 3-23 zeigt den Western Blot für *MYH7* (= β MHC). Die Gruppen setzten sich

wie folgt zusammen: WT Sham (n=8), TG Sham (n=6), WT TAC (n=8) und TG TAC (n=7). Dabei wurde LC3 als Marker des Autophagie-Niveaus herangezogen. p62 ist ein Substrat, welches mittels Autophagie abgebaut wird (Bjorkoy et al. 2005). Die GTPase Rab7 ist an der Reifung der Endosomen (Feng et al. 1995) sowie dem Transport der Autophagosomen beteiligt (Gutierrez et al. 2004) (Jager et al. 2004). *MYH7* kodiert für das β MHC, einem Sarkomerprotein der Muskelzelle. In einem von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde es als möglicher Interaktionspartner von Fyco1 identifiziert und deshalb hier näher untersucht. Im folgenden Kapitel 3.4.1 wird die Protein-Protein-Interaktion zwischen Fyco1 und β MHC mittels Co-Immunopräzipitation dargestellt.

Im LC3-Blot wurde der Quotient von LC3-II zu Tubulin als Marker des Autophagie-Niveaus verwendet. Hier zeigte sich nach TAC kein signifikanter Anstieg des LC3-II in den Wildtyp-Mäusen (n.s.). LC3-II/Tubulin war jedoch im Vergleich zu den Wildtypen in den transgenen Tieren unabhängig vom OP-Verfahren 8,5- und 7,7-fach hochreguliert ($p < 0,001$). Der p62-Blot zeigte eine vergleichbare 5,5- und 7,7-fache Hochregulation in den transgenen Tieren, die unabhängig der OP zu quantifizieren war ($p < 0,001$). Im Rab7-Blot konnte ein vergleichbares Ergebnis gezeigt werden: Die transgenen Tiere exprimieren unabhängig von der OP mehr Rab7 im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,05$). Bei den scheinoperierten, transgenen Tieren ist es 1,28-fach hochreguliert.

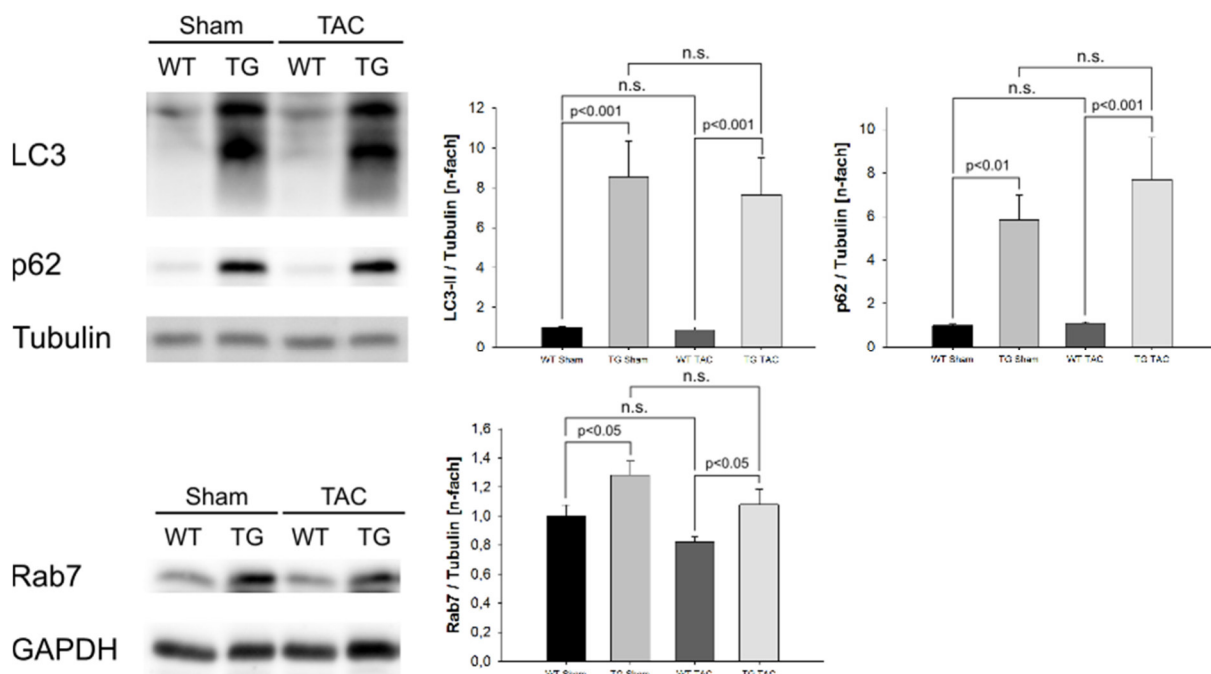


Abbildung 3-22: Proteinexpression im Herzen nach Scheinoperation bzw. aortaler Konstriktion.

Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte zunächst als Normalisierung zu Tubulin bzw. GAPDH als Ladekontrolle. Die daraus resultierenden Quotienten wurden durch den Mittelwert der Wildtypen geteilt, sodass die Expression in Relation zu den Wildtypen angegeben werden kann [n-fach]. WT = Wildtyp-Maus, TG = transgene

Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. In den Balkendiagrammen sind von links nach rechts wird folgende Reihenfolge angegeben: WT Sham (schwarz, n=8), TG Sham (grau, n=6), WT TAC (dunkelgrau, n=8), TG TAC (hellgrau, n=7). **LC3-Blot.** Balkendiagramm oben links. Die transgenen Tiere zeigen unabhängig der Operation eine signifikante Autophagie-Induktion gegenüber den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,001$). Die Wildtypen zeigen nach TAC keine Autophagie-Induktion im Vergleich zu den scheinooperierten WT (n.s.). **p62-Blot.** Balkendiagramm oben rechts. Die Überexpression von Fyco1 lässt die p62-Expression steigern. (WT Sham vs. TG Sham, $p < 0,01$) Die p62-Expression ist jedoch unabhängig der Operation (WT Sham vs. WT TAC, n.s., TG Sham vs. TG TAC, n.s.). **Rab7-Blot.** Balkendiagramm unten links. Die Überexpression von Fyco1 lässt die Rab7-Expression steigern. (WT Sham vs. TG Sham, $p < 0,05$) Die Rab7-Expression ist jedoch unabhängig der Operation (WT Sham vs. WT TAC, n.s., TG Sham vs. TG TAC, n.s.).

Beim MYH7-Blot wurde die β MHC-Expression auf Ponceau S normalisiert. Die Expression des β MHC ist von unterschiedlichen Stimuli reguliert. So führt eine Druckbelastung des Herzens mit nachfolgender Hypertrophie und zu einem Anstieg des β MHC (Kariya et al. 1994) (Litten et al. 1982). Dieser sogenannte Myosin-Isoformenwechsel ist in Kapitel 4.2 näher beschrieben. Nach aortaler Konstriktion der Wildtyp-Mäuse verzeichnete β MHC erwartungsgemäß eine starke Hochregulation (9,4-fach, $p < 0,001$). Dies konnte auch in den Fyco1-transgenen Tieren festgestellt werden (4,8-fach). Interessanterweise war die Expression der transgenen Tieren gegenüber den Wildtyp-Mäusen nach aortaler Konstriktion signifikant geringer ($p < 0,05$).

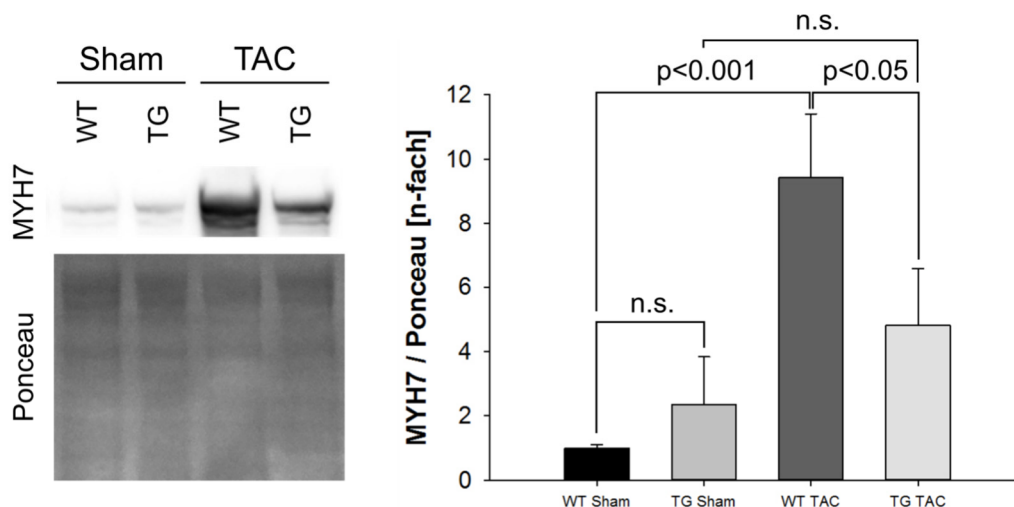


Abbildung 3-23: Expression von β MHC (MYH7) nach Scheinoperation und aortaler Konstriktion.

Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte zunächst als Normalisierung zu Ponceau S als Ladekontrolle. Die daraus resultierenden Quotienten wurden durch den Mittelwert der Wildtypen geteilt, sodass die Expression in Relation zu den Wildtypen angegeben werden kann [n-fach]. WT = Wildtyp-Maus, Fyco1-TG = transgene Maus, Sham = Scheinoperation, TAC = Konstriktion der A. transversa. Von links nach rechts wird folgende Reihenfolge angegeben: WT Sham (schwarz, n=8), TG Sham (grau, n=6), WT TAC (dunkelgrau, n=8), TG TAC (hellgrau, n=7). Die Konstriktion der A. transversa führt zu einer vermehrten Expression von β MHC (MYH7) (WT Sham vs. WT TAC, $p < 0,001$). Die Überexpression von Fyco1 vermindert jedoch die β MHC -Expression nach aortaler Konstriktion (WT TAC vs. TG TAC, $p < 0,05$).

3.4 Fyco1-Bindungspartner

3.4.1 Co-Immunopräzipitation mit β MHC (MYH7)

In einem von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen von FYCO1 untersucht. Auffällig ist, dass eine Vielzahl von Sarkomerproteinen als Interaktionspartner von FYCO1 infrage kommen. Um β MHC (MYH7) als Bindungspartner von FYCO1 bestätigen zu können, wurden die Proteine FYCO1 und MYH7 *in vitro* in HEK293-A-Zellen überexprimiert. Dabei war FYCO1 mit einem N-terminalen HA-Tag (HA-FYCO1) und MYH7 mit einem N-terminalen myc-Tag (myc-MYH7) versehen. Nach schonender Zellernte erfolgte die IP mit anti-HA-gekoppelten Beads, sodass die Interaktion von FYCO1 und MYH7 im myc-Blot bestätigt werden konnte. Das Transfektionsergebnis der jeweiligen Ansätze wird in den HA- und myc-Blots gezeigt (s. Abbildung 3-24 und Kapitel 2.2.5.7).

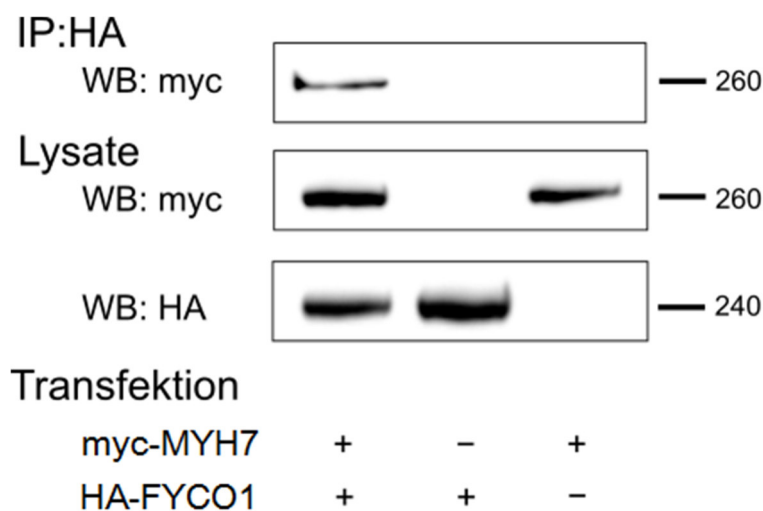


Abbildung 3-24: Co-IP von FYCO1 und MYH7.

HA-gekoppeltes FYCO1 (HA-FYCO1) und myc-gekoppeltes MYH7 (myc-MYH7) wurden in HEK293-A-Zellen transfiziert und die Zellenernte mit Ripa-Puffer lysiert. Das Transfektionsergebnis kann im HA- und myc-Blot der Lysate verifiziert werden. Die Immunopräzipitation erfolgte mit HA-gekoppelten Dynabeads® und der Bindungsnachweis im myc-Blot.

4 Diskussion

4.1 Fyco1-Überexpression und Autophagie-Induktion

Fyco1 ist ein in vor allem Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiertes Protein, welches mit wichtigen Proteinen der Autophagie interagiert. Wie nach den *in vitro* Versuchen (Abbildung 1-8) vermutet, konnten durch die Überexpression von Fyco1 in beiden Fyco1-TG-Linien höhere LC3-II-Spiegel gemessen werden, was für eine Anreicherung von Autophagosomen in diesen Zellen spricht. Dieser Effekt konnte in den doppelt transgenen Tieren der Linie Fyco1-TG x GFP-LC3-TG durch Kopplung des transgenen LC3 mit GFP mittels Fluoreszenzmikroskop auch visuell dargestellt werden. Die Anzahl der Autophagosomen war in den Fyco1-transgenen Tieren signifikant um das 51,4-fache erhöht (s. Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11). Dies zeigen zudem auch die elektronenmikroskopischen Bilder der Papillarmuskeln von Wildtyp und transgenen Mäusen, die freundlicherweise von Prof. Dr. Lüllmann-Rauch aus dem Anatomischen Institut der CAU Kiel angefertigt worden sind. Während in den Aufnahmen der Wildtyp-Mäuse kaum Autophagosomen zu finden sind, sind diese in den Aufnahmen der transgenen Mäuse zahlreich und ultrastrukturell intakt zu finden (s. Abbildung 3-12).

Neben der Ansammlung von Autophagosomen, zeigen sich auch Anzeichen einer kardialen Hypertrophie: Die Herzen der Fyco1-transgenen Mäuse beider Linien sind im Vergleich zu denen der Wildtypen makroskopisch schwerer (s. Abbildung 3-4). Echokardiographisch ergibt sich ebenfalls der Hinweis auf dickere Herzwände in Linie F bzw. einem größeren, enddiastolischen LV-Durchmesser bei Linie A ohne, dass es zu funktionellen Einschränkungen im Fractional Shortening kommt (s. Tabelle 3.1). Zudem sind die Kardiomyozyten mikroskopisch hypertrophiert (s. Abbildung 3-8). Diese ist jedoch nicht so stark ausgeprägt, dass auch das hypertrophe Genprogramm auf RNA-Ebene signifikante Unterschiede zwischen den Fyco1-überexprimierenden Tieren und den Wildtypen zeigt, obwohl ein Trend zu höheren Genexpressionen erkennbar ist (s. Kapitel 3.1.5). Zeichen einer Herzinsuffizienz lassen sich bei den transgenen Tieren nicht verzeichnen. Lungen- und Lebergewicht unterscheiden sich nicht voneinander (s. Abbildung 3-4).

Nach aortaler Konstriktion der Wildtyp-Mäuse zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Autophagie-Niveaus verglichen mit den scheinoperierten Wildtypen. In unserem Fall handelt es sich jedoch um eine schwerwiegende Konstriktion der Aorta (severe TAC). Diese verläuft als Herzhypertrophie mit konsekutiver Entwicklung einer Herzinsuffizienz, da die linksventrikuläre Pumpfunktion (Ejektionsfraktion) der operierten Wildtyp-Mäuse signifikant geringer ist (s. Tabelle 3.3). Unsere Arbeitsgruppe führte zuvor vergleichbare aortale

Konstriktionen an *Fyco1*-defizienten und Wildtyp-Mäusen durch und untersuchte die Tiere bereits 7 Tage nach der OP. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich in den operierten Wildtypen erhöhte LC3-Spiegel nachweisen. Verglichen damit sowie mit den Ergebnissen von Zhu et. al. von 2007 könnte es sich bei unserem Versuch um ein beschleunigtes Modell handeln, bei dem die LC3-Spiegel bereits nach zwei Wochen wieder abfallen und deshalb nicht mehr erhöht nachweisbar sind. Dadurch ist auch in den *Fyco1*-transgenen Tieren kein Unterschied des LC3-II-Levels zwischen der Scheinoperation und der aortalen Konstriktion zu verzeichnen.

4.2 Der Myosin-Isoformenwechsel bei der kardialen Hypertrophie

Das Myosin ist ein Motorprotein der Muskelzelle. Es liegt als Dimer vor und besteht aus insgesamt sechs Untereinheiten: die zwei schweren und vier leichten Ketten. Bei der schweren Kette des Myosin (MHC = Myosin heavy chain) können in den Kardiomyozyten wiederum zwei Formen unterschieden werden: das α MHC (kodiert vom *MYH6*) und das β MHC (kodiert vom *MYH7*). Diese zwei schweren Ketten bilden zusammen eine alpha-Helix mit einem Myosinköpfchen. Je nach Zusammensetzung von α MHC und β MHC entstehen die drei Isoformen α - α (V1), α - β (V2) und β - β (V3). Das Myosinköpfchen enthält dabei die ATPase-Aktivität mit der das Myosin innerhalb des kontraktiven Apparates entlang der Actin-Fasern ineinander gleitet und so eine Muskelkontraktion bewirken kann (Harrington und Rodgers 1984). Die zwei unterschiedlichen schweren Ketten sind zwar zu 93% ihrer Aminosäuresequenz identisch zueinander (McNally et al. 1989), unterscheiden sich jedoch in der Kontraktilität und ATPase-Aktivität sowie in der unterschiedlichen Zusammensetzung. Interessanterweise korreliert die Geschwindigkeit, mit welcher der Muskel sich verkürzt mit der ATPase-Aktivität des Myosins (Barany 1967). *In vitro* Versuche zeigen, dass die ATPase-Aktivität des α - α MHC doppelt so hoch und die Verkürzungsgeschwindigkeit drei Mal schneller ist als die des β - β MHC. Allerdings zeigt letztere eine durchschnittlich doppelt so große Kontraktilkraft im Vergleich zum α - α MHC (VanBuren et al. 1995). So haben kleine Säugetiere mit hoher Herzfrequenz wie Ratten eine Prädominanz des α - α -Homodimer (V1) (Alpert et al. 2002), während bei größeren Säugetieren mit niedriger Herzfrequenz wie Kaninchen das β - β MHC (V3) überwiegt (Reiser et al. 2001) (s. Abbildung 4-1). Der Anteil der jeweiligen Isoform ist jedoch auch vom Alter des Tieres abhängig: Während bei der Geburt ein hoher Anteil des α MHC vorliegt, nimmt dieser Anteil im Laufe des Lebens ab und der des β MHC hingegen zu (Lompre et al. 1981). Der Gesamtanteil des MHC bleibt hingegen konstant. Diese komplementäre Beziehung legt die Vermutung nahe, dass im Laufe des Lebens das α MHC durch das β MHC ersetzt wird (Velden et al. 1998). Bei Menschen wird ein ähnlicher Sachverhalt vermutet. Beim Neugeborenen wird der Anteil des α MHC auf etwa 70% des

Gesamtmyosins geschätzt (Herron 2005), während es beim Erwachsenen nur etwa 30% auf mRNA- und etwa 10-12% auf Proteinebene sind (Miyata et al. 2000).

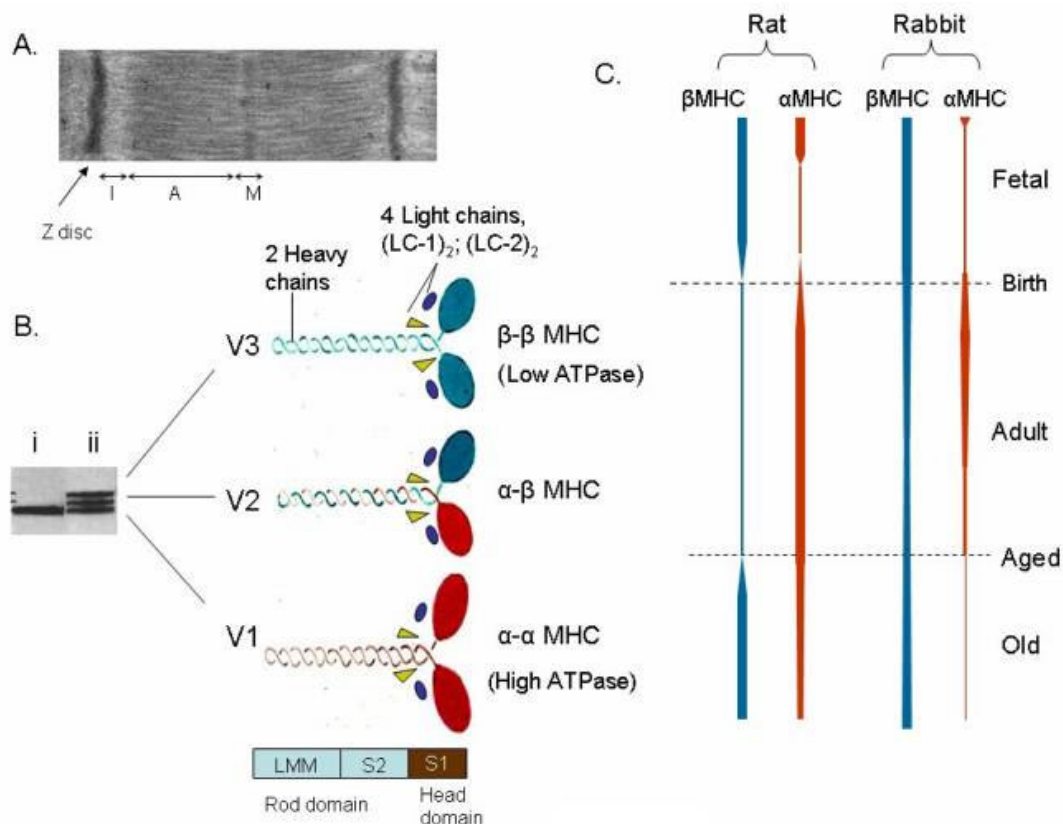


Abbildung 4-1: MHC Isoformen. Strukturelle Anordnung und Regulation (Gupta 2007).

A. Elektronenmikroskopische Darstellung der Sarkomerstruktur eines Rattenherzens. Das Myosin befindet sich in der A-Bande des Sarkomers. **B.** Auftrennung der MHC-Isoformen aus einem jungen (i) und gealterten (ii) Rattenherz (Clark et al. 1982). Die Isoformen V1, V2 und V3 entstehen aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung aus zwei schweren und vier leichten Ketten. **C.** Schematische Darstellung der MHC-Expression in Ratten- und Kaninchenherzen während der Fetalperiode, dem Erwachsenenalter und beim gealterten Tier. (Lompre et al. 1981) (Lompre et al. 1984) (Everett et al. 1984).

Die Expression des α - und β MHC ist von unterschiedlichen Stimuli reguliert. So führen α 1-Agonisten wie Noradrenalin durch einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand zu einer Druckbelastung des Herzens und zu einem Anstieg des β MHC (Kariya et al. 1994). Ebenso verhält es sich mit der Expression nach aortaler Konstriktion (Litten et al. 1982). β 1-Agonisten wie Dobutamin hingegen bewirken durch einen positiv chronotropen eine Steigerung der α MHC-Expression (Winegrad S 1987). Dieser Effekt wird auch durch eine sportliche Betätigung erreicht (Rupp 1989).

Durch die bessere Energieeffizienz und die größere Kontraktionskraft der V3-Isoform könnte der Wechsel von $\alpha\alpha$ zu $\beta\beta$ MHC bei chronischer Nachlasterrhöhung des Herzens zunächst sogar von Vorteil sein. Jedoch ist der Anteil von $\alpha\alpha$ MHC bei Patienten mit schwerer

Herzinsuffizienz zunehmend geringer, während die β - β MHC-Expression stärker zunimmt. Die relative Expression der α MHC mRNA nimmt sogar von durchschnittlich 30 % auf nur 2 % ab (Miyata et al. 2000). Diese Veränderungen könnten ein sensibler Marker beim Wandel von adaptiver Hypertrophie zur Herzinsuffizienz sein. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass eine Steigerung der α - α MHC-Expression einen kardioprotektiven Effekt bei der Entwicklung einer tachyarrhythmisch induzierten Kardiomyopathie bewirken kann (James et al. 2005). Dieser Effekt könnte genutzt werden, um zum reversen kardialen Remodeling beizutragen und die Entwicklung einer maladaptiven kardialen Hypertrophie rückgängig zu machen.

Diese Auswirkungen können wir in unseren Versuchen bestätigen. Die kardiale Hypertrophie erfolgt – wie in Kapitel 1.1 erörtert – entweder physiologisch oder pathologisch (s. Abbildung 1-1). Die *Fyco1*-transgenen Tiere zeigen in der Basischarakterisierung eine kardiale Hypertrophie vergleichbar zur physiologischen Adaptation im Wachstum, im Sport oder während der Schwangerschaft, da die Herzen zwar schwerer (s. Kapitel 3.1.2), aber funktionell nicht eingeschränkt sind. Das Fractional Shortening unterscheidet sich nicht zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen (s. Kapitel 3.1.3). Nach aortaler Konstriktion (Nachlasterhöhung) nimmt die β MHC-Expression der Wildtyp-Mäuse auf Proteinebene erwartungsgemäß zu (WT: Sham vs. TAC, $p < 0.001$). Jedoch ist die Expression des β MHC in den *Fyco1*-transgenen Mäusen nach aortaler Konstriktion weniger ausgeprägt als in den Wildtyp-Geschwistertieren (TAC: WT vs. TG, $p < 0,05$). Diese Veränderung ist bei der Genexpression des *Myh7* weniger stark ausgeprägt. Es lässt sich jedoch ein Trend erkennen, nachdem in den transgenen Tieren nach TAC geringere Mengen des *Myh7* exprimiert werden. Durch diesen weniger stark ausgeprägten MHC-Isoformenwechsel nach aortaler Konstriktion in den *Fyco1*-transgenen Mäusen profitieren sie mit einer verbesserten Herzfunktion. Dies zeigt sich in einer vergleichbaren Ejektionsfraktion in den transgenen Tieren nach TAC verglichen zu den scheinoperierten, transgenen Tieren (TG: Sham vs TAC, $p > 0,05$). Die Wildtypen weisen hingegen nach aortaler Konstriktion eine signifikant schlechtere EF auf (WT: Sham vs. TAC, $p < 0,05$).

Außerdem nimmt die Masse des Ventrikelmyokards in den transgenen Tieren nach TAC nicht weiter zu. Das Verhältnis von Herz- bzw. LV-Gewicht zu Körpergewicht oder Tibialänge in den transgenen Tieren ist nach TAC im Vergleich zur Sham-OP nicht vergrößert (TG: Sham vs. TAC, n.s.). Die Wildtyp-Mäuse hingegen verzeichnen nach TAC eine signifikante Zunahme des Herz- und LV-Gewichtes bezogen aufs Körpergewicht und die Tibialänge (WT: Sham vs. TAC, $p < 0,01$). Diese Zunahme ist als Remodeling des Ventrikelmyokards zu verstehen, da die Gene des Hypertrophen Genprogrammes hochreguliert werden (WT: Sham vs. TAC, *Nppa*:

$p < 0,01$; *Nppb*: $p < 0,01$; *MYH7*: $p < 0,01$). Dieses Remodeling ist in den transgenen Tieren nicht zu verzeichnen (n.s.).

4.3 Die Fyco1-Interaktion mit β MHC (MYH7)

In dieser Arbeit zeigen die *Fyco1*-transgenen Tiere ein erhöhtes Autophagie-Niveau (LC3-II/Tubulin), die Gen- und Proteinexpressionen des *Myh7* bzw. β MHC ist unter basalen Bedingungen jedoch nicht verändert. Dennoch kann das kardiale Remodeling nach TAC protektiv beeinflusst werden. Von großer Bedeutung für die verminderte β MHC-Expression der transgenen Tiere nach aortaler Konstriktion ist die *in vitro* Co-Immunopräzipitation, in der β MHC (*Myh7*) als Bindungspartner von *Fyco1* identifiziert werden konnte (s. Abbildung 3-24). Durch diesen Nachweis könnte ein neuer Regulationsmechanismus von β MHC aufgezeigt werden, der vielleicht sogar durch ein reverses Remodeling bei der kardialen Hypertrophie eine verbesserte Herzfunktion bewirken kann. Möglicherweise kann *Fyco1* β MHC den Autophagosomen selektiv zuführen und so mittels Lysosomen abbauen, um dem langfristig pathologischen Myosin-Isoformenwechsel entgegenzuwirken. Bisher ist der Abbau der MHC-Proteine nur mittels Proteasomen bekannt (Eble et al. 1999) (Solomon und Goldberg 1996). Über einen Zusammenhang des Myosin II zur Autophagie wird erst in jüngster Vergangenheit diskutiert. Neue Forschungsergebnisse zeigen eine Regulation der Myosin II-Aktivität über den ULK1-Komplex der Autophagie bei Nahrungsmangel (Tang et al. 2011). Unsere Arbeit zeigt erstmalig eine Regulation des kardialen β MHC durch eine Autophagie-Induktion bei chronischer Nachlasterhöhung. Weitere Untersuchungen sollten beleuchten wie sich dies medizinisch sinnvoll nutzen lässt, damit Patienten mit kardialer Hypertrophie oder Herzinsuffizienz von diesem Effekt profitieren können. Zudem sollten weitere potentielle Interaktionspartner in einer Co-IP identifiziert werden, um die Regulationsmechanismen besser verstehen zu können.

4.4 Fyco1 und das hypertrophe Genprogramm

Gene, die in der fetalen Entwicklung für das Wachstum der Herzmuskelzellen essenziell waren, werden bei der kardialen Hypertrophie im Erwachsenenalter erneut induziert. Diese Reinduktion fetaler Genprogramme ruft über verschiedene Signalwege und Wachstumsfaktoren einen veränderten zellulären Phänotyp hervor, der über längere Zeit in die myokardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz mündet (Parker 1995). Die erhöhte Expression ist unter anderem für folgende im Herzen exprimierte Gene beschrieben: Für *Nppa*, welches für das atriale natriuretische Peptid (ANP) kodiert (Winer et al. 1999) (Izumo et al. 1988) sowie für *Nppb*, welches für das B-natriuretische Peptid (BNP) kodiert (Wiese et al.

2000). Das Gen *Myh7* ist ebenfalls bei kardialer Hypertrophie hochreguliert (Izumo et al. 1987) (Hwang et al. 2002) (Razeghi et al. 2003) und kodiert für die β -Myosin schwere Kette (β MHC) des kontraktiles Apparates der Herzmuskelzelle. Es gilt bei kleinen Säugetieren als fetale Form des MHC, während die α -Myosin schwere Kette (α MHC) als adulte Form angesehen werden kann (s. Abbildung 4-1, C). Der in Kapitel 4.2 diskutierte Isoformenwechsel des Myosins, kann also auf Protein- und Gen-Ebene nachvollzogen werden. Auch das Gen *RCAN1*, welches für den regulator of calcineurin 1 isoform 4 kodiert, wird durch eine aortale Konstriktion induziert (da Costa Martins et al. 2010). So dienen unter anderem die Genexpressionen von *Nppa*, *Nppb*, *Myh7* und *RCAN1* als molekulare Marker einer kardialen Hypertrophie und werden in dieser Arbeit als „hypertrophes Genprogramm“ zusammengefasst.

In der Basischarakterisierung zeigt sich, dass die alleinige Überexpression von *Fyco1* nur sehr geringe Auswirkungen auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie hat. Das Expressionsniveau von *Nppa*, *Nppb* und *RCAN1* war statistisch nicht signifikant höher als bei den Wildtyp-Geschwistertieren (s. Abbildung 3-9). Nach aortaler Konstriktion hingegen, konnte in den *Fyco1*-transgenen Tieren keine signifikante Entwicklung einer kardialen Hypertrophie im Genprogramm verifiziert werden, während die Wildtyp-Mäuse nach TAC erwartungsgemäß eine Induktion der Gene *Nppa*, *Nppb* und *Myh7* zeigten (s. Abbildung 3-21). Somit ist durch die Überexpression von *Fyco1* und das daraus resultierende, erhöhte Autophagie-Niveau nicht nur das Proteasom verändert, sondern auch die Genregulation dahingehend beeinflusst, dass die maladaptiven Prozesse des kardialen Remodelings bei chronischer Nachlastserhöhung vermindert induziert werden. Weitergehende Untersuchungen sollten der Frage nachgehen, in welche Signalwege *Fyco1* integriert ist und wie diese die Genexpression regulieren.

Die molekularen und morphologischen Erkenntnisse dieser Arbeit spiegeln sich in denen der Echokardiographie wider. So zeigen die Ergebnisse der Basischarakterisierung morphologisch schwerere Herzen, histologisch vergrößerte Kardiomyozyten und echokardiographisch verdickte Herzwände der *Fyco1*-transgenen Tiere. Im Versuch der aortalen Konstriktion wird der funktionelle Nutzen, den die *Fyco1*-Überexpression erzielt deutlich: Molekular zeigt sich nach TAC in den *Fyco1*-TG Mäusen eine geringere Induktion des „hypertrophes Genprogramms“ sowie eine geringere Expression des fetalen β MHC. Dies resultiert echokardiographisch in einer verbesserten Herzfunktion. So sind die Ejektionsfraktion und das Fractional Shortening gegenüber den Wildtyp-Mäusen nach TAC nicht verschlechtert.

4.5 Der intrazelluläre Transport von Autophagosomen

Fyco1 bindet als Dimer an die autophagosomalen, membranständigen Proteine PI3P, Rab7 und über eine C-terminale LC3-interagierende Region (LIR) mit LC3 (Olsvik et al. 2015) (Pankiv et al. 2010). Außerdem führt die Überexpression von FYCO1 zur Umverteilung von LC3 und Rab7-ähnlichen Strukturen in die Zellperipherie vergleichbar mit dem Mikrotubuli-assoziierten Transport (Pankiv und Johansen 2010). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass es in der Autophagie eine wichtige Rolle als Bindungsprotein zwischen den Plus-End-Motorproteinen (Kinesinen) der Mikrotubuli und den Autophagosomen spielen könnte, da es für Kinesine eine potentielle Bindungsstelle aufweist (Pankiv et al. 2010) (s. Abbildung 4-2).

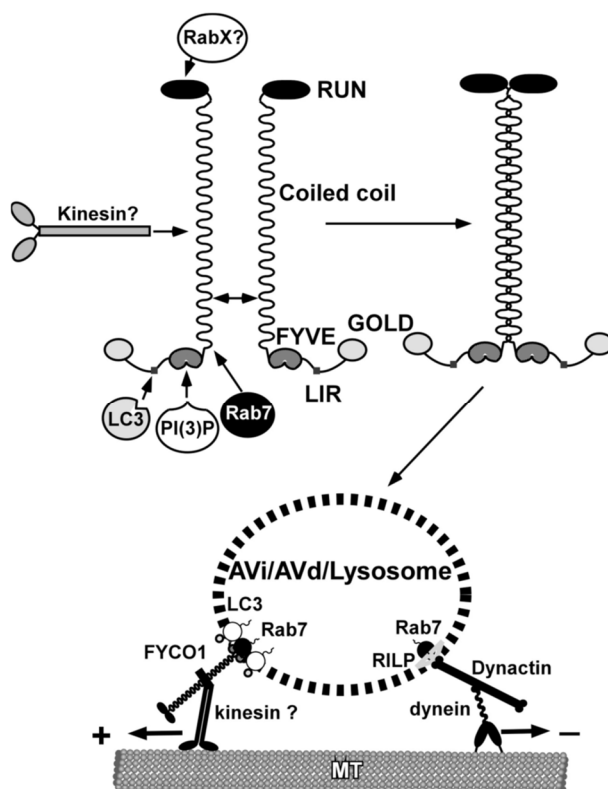


Abbildung 4-2: Mögliche FYCO1-Funktion als Bindungspartner der Kinesine (Pankiv et al. 2010).

FYCO1 hat eine N-terminale RUN-Region mit möglicher Bindungsstelle für Proteine der Rab-Familie. Die CC Region (Coiled coil) weist eine potentielle Bindungsstelle der Kinesine auf und ist verantwortlich für die Dimerisierung von FYCO1. Im C-terminalen Cluster (FYVE, GOLD) wurden die Interaktionen zu LC3, PI3P und Rab7 nachgewiesen. Rab7 interagiert über RILP mit Dynactin/ Dynein für einen Minus-End gerichteten Transport.

Die GTPase Rab7 ist an der Reifung der Endosomen (Feng et al. 1995) sowie dem Transport der Autophagosomen beteiligt (Gutierrez et al. 2004) (Jager et al. 2004). Außerdem ist es bei der Fusion von Endosomen mit Lysosomen involviert (Bucci et al. 2000). Der Transport der Endosomen wird dabei über den Rab7 Effektor RILP (Rab7-interacting lysosomal protein) zum Dynein/ Dynactin vermittelt (Cantalupo et al. 2001) (Jordens et al. 2001) (s. Abbildung 4-2). Der Transport der Autophagosomen soll über die Interaktion von Rab7 mit Fyco1, vermutlich zu den Plus-Ende-Motorproteinen (Kinesinen) der Mikrotubuli, vermittelt werden. Zudem verhalten sich Fyco1 und RILP in der Interaktion mit Rab7 kompetitiv zueinander (Pankiv et al. 2010).

In vitro Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigen bei Infektion neonataler Rattenkardiomyozyten (NRCM) mit einem AdFyco1 eine starke Hochregulation der Rab7-Expression gegenüber den AdLacZ-infizierten Zellen. Auch unsere *in vivo* Daten der aortalen Konstriktion zeigen hinsichtlich der transgenen Tiere eine Überexpression des Rab7 gegenüber den Wildtypen, die unabhängig von der Operation ist (Sham: WT vs. TG, $p < 0,05$ und TAC: WT vs. TG, $p < 0,05$).

Damit ein Autophagosom mit einem Lysosom verschmelzen kann, wird das Autophagosom entlang der Mikrotubuli von perinukleär in die Zellperipherie transportiert. Um miteinander zu verschmelzen, werden bei Säugetieren zum einen die GTPase Rab7 und zum anderen das lysosomale Membranprotein LAMP-2 benötigt (Jager et al. 2004). Dabei verschmilzt nur die äußere Membran des Autophagosoms mit der einfachen Membran des Lysosoms. Anschließend erfolgt der Abbau der Zellbestandteile mittels lysosomaler Enzyme. SQSTM1/p62 ist ein Substrat, welches mittels Autophagie abgebaut wird (Bjorkoy et al. 2005). In unserer Arbeit ist das p62-Level unabhängig von der Operation in den Fyco1 transgenen Tieren beider Linien signifikant erhöht. Das spricht für einen verminderten Abbau des p62 mittels Autophagie. In den Kardiomyozyten der transgenen Tiere zeigte sich jedoch ein höheres Autophagie-Niveau als in den Wildtyp-Geschwistertieren – beschrieben als LC3-II/Tubulin (s. Abbildung 3-13) – sowie eine vermehrte Anzahl von Autophagosomen/Zelle (s. Kapitel 3.1.6). Diese sind ultrastrukturell intakt und weisen keine pathologischen Veränderungen auf. Das höhere P62-Level könnte einerseits ein Hinweis dafür sein, dass der Transport der Autophagosomen nicht zum Ort der Fusion mit einem Lysosom führt. Andererseits könnte die Anzahl der Lysosomen auch nicht ausreichend sein, um die große Menge an Autophagosomen zu degradieren, sodass es zu einem Stau der Autophagosomen kommt. Das GFP der fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemachten Autophagosomen ist jedoch nicht pH-stabil (Ward 1981). Im sauren Milieu mit einem $pH < 6$ nimmt seine Konzentration ab, sodass Autophagolysosomen – das sind fusionierte Autophagosomen, die bereits abgebaut werden – nicht visualisiert werden können. Die Arbeitsgruppe um Dr. Kuhn wird dieser Frage weiter nachgehen und untersuchen wie viele Autophagosomen tatsächlich dem Abbau zugeführt werden können. Dazu werden Fyco1-TG x GFP-RFP-LC3 transgene Mäuse verwendet, bei denen das LC3 pH-abhängig entweder grün (Autophagosom, $pH > 6$) oder rot (Autophagolysosomen, $pH < 6$) fluoresziert.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit den kardialen Auswirkungen der Fyco1-Überexpression und der daraus resultierenden Autophagie-Induktion im Kontext der Herzhypertrophie bei chronischer Nachlasterhöhung.

Die Herzhypertrophie führt unbehandelt in das Stadium der Herzinsuffizienz – einem tödlichen Krankheitsbild. Um neue Behandlungsmethoden zur Vermeidung der Herzinsuffizienz zu ergründen, rückt der Mechanismus der Autophagie zunehmend in den Fokus von Untersuchungen zu den pathologischen Umbaumechanismen wie dem kardialen Remodeling. Die Autophagie ist ein lysosomaler Degradationsmechanismus, der defekte Proteine und Organellen für die De-novo-Synthese recycelt. So konnten einige Versuche und Mausmodelle bereits einen Zusammenhang von kardialer Funktion und veränderter Autophagie-Aktivität herstellen. Es gibt konkrete Hinweise, dass das weitestgehend muskelspezifisch exprimierte Protein Fyco1 in der Regulation der Autophagie-Aktivität eine wichtige Rolle spielt. Ein Knockout Mausmodell zeigte nach chronischer Nachlasterhöhung durch aortale Konstriktion eine signifikant schlechtere Herzfunktion. Um diesen Zusammenhang stärker zu beleuchten, wurde ein transgenes Mausmodell zur kardialen Fyco1-Überexpression generiert und charakterisiert. In einem weiteren Versuch wurden diese Tiere einer chronischen Nachlasterhöhung über eine aortale Konstriktion ausgesetzt und die Auswirkungen im Anschluss untersucht. Abschließend sollten mögliche Interaktionspartner von Fyco1 identifiziert werden, um weitere Regulationspunkte beim kardialen Remodeling aufdecken zu können.

Die Fyco1-transgenen Mäuse zeigten in zwei unterschiedlichen Linien der Basischarakterisierung eine starke Autophagie-Induktion (beschrieben als LC3-II/Tubulin) sowie morphologisch schwerere Herzen. Letzteres ist am ehesten durch eine moderate Hypertrophie bedingt, da sich größere Kardiomyozyten nachweisen ließen und ein Trend zur höheren Genexpression des hypertrophen Genprogramms zeigte. Das hohe Autophagie-Niveau konnte fluoreszenzmikroskopisch als Ansammlung der Autophagosomen visualisiert werden, nachdem die Fyco1-TG Linie im Hintergrund der GFP-LC3 transgenen Linie gezüchtet worden war.

Um die Auswirkungen einer chronischen Nachlasterhöhung auf die kardiale Funktion simulieren zu können, wurde den Tieren operativ die Aorta transversa mittels Ligatur verengt (TAC) und diese mit scheinoperierten Geschwistertieren (Sham) verglichen. Dabei zeigte sich nach aortaler Konstriktion und daraus resultierender chronischer Nachlasterhöhung eine Protektion der transgenen Tiere gegenüber den Wildtyp-Mäusen bei der Entwicklung einer

kardialen Dysfunktion. Dies zeigt sich echokardiographisch in einer gleichbleibenden Ejektionsfraktion und einem unveränderten Fractional Shortening der operierten gegenüber den scheinoperierten Fyco1-transgenen Mäusen. Morphologisch zeigt sich außerdem ein geringeres Lungengewicht in den operierten Fyco1-transgenen Tieren gegenüber den Wildtypen, vermutlich dadurch, dass der linke Ventrikel keine Zeichen einer Insuffizienz aufweist.

Des Weiteren wurde β MHC (MYH7) aufgrund eines vorangegangenen Hefe-Zwei-Hybrid-System als Bindungspartner von Fyco1 identifiziert. Vermutlich kann durch diese Interaktion in den transgenen Tieren nach aortaler Konstriktion eine signifikant geringere Menge des β MHC auf Proteinniveau festgestellt werden. Der Myosin-Isoformenwechsel ist folglich bei den transgenen Tieren geringer ausgeprägt.

Somit zeigt diese Arbeit, dass durch die Fyco1-Überexpression und das damit hochregulierte Autophagie-Niveau das Herz bei chronischer Druckbelastung einem verminderten Remodeling unterliegt. Die verbesserte Herzfunktion hat zur Folge, dass die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und damit eine erhöhte Sterblichkeit hinausgezögert werden kann. Die Überexpression von Fyco1 führt folglich zu einem Überlebensvorteil bei chronischer Druckbelastung. Weiterführende Untersuchungen sollten klären, wie dieser Effekt für den Menschen medizinisch sinnvoll genutzt werden kann.

Abstract

Erschienen: Clinical Research in Cardiology, 106, Supplement 1, P392, 2017

Cardiac specific overexpression of FYCO1 *in vivo* induces autophagy and blunts cardiac dysfunction due to pressure overload

M. Menke¹, I. Schmidt¹, F. Dierck¹, S. Hille¹, R. Lüllmann-Rauch², N. Frey¹, C. Kuhn¹

¹Klinik für Innere Medizin III, Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel; ²Anatomisches Institut Universität Kiel, Kiel

DOI: 10.1007/s00392-017-1105-2

Recently, FYCO1 has been linked to autophagy as it directly interacts with LC3, Rab7, and PI3P. It appears to be part of the machinery that moves autophagosomes along the microtubules. We have shown before that FYCO1 deficient mice develop normally under baseline conditions. However, under stress conditions, such as starvation or pressure overload, FYCO1 knockout mice do not respond with increased autophagy in the heart and suffer from contractile dysfunction.

We wondered whether FYCO1 overexpression might have beneficial effects by facilitating cardiac autophagy. We generated a transgenic mouse model with cardiac specific overexpression of FYCO1. We established 2 founder lines with a moderate (13.1 ± 1.3 -fold) and a high (20.1 ± 2.4 -fold) overexpression of FYCO1 protein. The 2 transgenic mouse lines (TG) showed a similar phenotype under basal conditions. TG mice developed mild cardiac hypertrophy. The ratio of heart weight vs. body weight was elevated. Moreover, we found a thickened septum as well as left ventricular posterior wall in TG mice by echocardiography, while fractional shortening was not changed. Accordingly, cardiomyocyte cell surface area was increased in FYCO1 TG mice. Though, the expression of hypertrophic marker genes did not significantly differ.

Of note, overexpression of FYCO1 *in vivo* leads to accumulation of LC3-II protein in the heart, which indicates an increased number of autophagosomes. In order to directly count the number of autophagosomes we generated double transgenic mice that overexpress FYCO1 as well as GFP-LC3. Indeed, we found significantly more autophagosomes in heart sections of FYCO1 TG mice. The ultrastructure of autophagosomes was not different in transgenic mice, but we again detected more autophagosomes.

Next, we subjected TG mice as well as their wildtype littermates (WT) to transverse aortic constriction (TAC). As expected, WT mice developed left ventricular hypertrophy 2 weeks after TAC. Similar to the baseline data, sham operated TG mice revealed mild cardiac hypertrophy. Interestingly, the ratio of left ventricular mass vs. body weight of banded TG and WT mice was identical implying that the additional hypertrophy due to TAC was less pronounced in TG mice. WT mice exhibited heart failure with elevated lung weight, as a marker of pulmonary congestion, and reduced ejection fraction after TAC. In contrast, the lung weight as well as the ejection fraction of banded TG animals was markedly better and almost completely preserved. The hypertrophic phenotype of banded WT animals was accompanied by an induction of hypertrophic marker genes (*Nppa*, *Nppb*, *Myh7*). In TG mice the induction of these genes by TAC was milder and not statistically significant.

To examine the underlying mechanism that is responsible for the contractile phenotype, we performed a yeast two-hybrid screen with FYCO1 as bait. We identified Myh7 as potential interacting protein and confirmed the interaction by co-immunoprecipitation. Myh7 is a member of the “fetal gene program”, upregulated during pathological hypertrophy. Consistently, Myh7 protein was induced in WT mice after TAC. However, overexpression of FYCO1 resulted in mitigated induction of Myh7 protein following TAC, which might contribute to preservation of contractile function.

In summary, we could show that cardiac specific overexpression of FYCO1 *in vivo* leads to increased autophagy and protects the heart from dysfunction following pressure overload.

Literaturverzeichnis

Alpert, N. R., Brosseau, C., Federico, A., Krenz, M., Robbins, J., Warshaw, D. M. (2002): Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 283, H1446-1454

Barany, M. (1967): ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of general physiology*, 50, Suppl:197-218

Berk, B. C., Fujiwara, K., Lehoux, S. (2007): ECM remodeling in hypertensive heart disease. *The Journal of clinical investigation*, 117, 568-575

Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., Johansen, T. (2005): p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of cell biology*, 171, 603-614

Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., Johansen, T. (2009): Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*, 452, 181-197

Bonne, G., Carrier, L., Richard, P., Hainque, B., Schwartz, K. (1998): Familial hypertrophic cardiomyopathy: from mutations to functional defects. *Circulation research*, 83, 580-593

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., van Deurs, B. (2000): Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Molecular biology of the cell*, 11, 467-480

Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C. B., Bucci, C. (2001): Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *The EMBO journal*, 20, 683-693

Cheng, Z., Fang, Q. (2012): Danon disease: focusing on heart. *J Hum Genet*, 57, 407-410

Clark, W. A., Jr., Chizzonite, R. A., Everett, A. W., Rabinowitz, M., Zak, R. (1982): Species correlations between cardiac isomyosins. A comparison of electrophoretic and immunological properties. *The Journal of biological chemistry*, 257, 5449-5454

Cullup, T., Kho, A. L., Dionisi-Vici, C., Brandmeier, B., Smith, F., Urry, Z., Simpson, M. A., Yau, S., Bertini, E., McClelland, V., Al-Owain, M., Koelker, S., Koerner, C., Hoffmann, G. F., Wijburg, F. A., ten Hoedt, A. E., Rogers, R. C., Manchester, D., Miyata, R., Hayashi, M., Said, E., Soler, D., Kroisel, P. M., Windpassinger, C., Filloux, F. M., Al-Kaabi, S., Hertecant, J., Del Campo, M., Buk, S., Bodi, I., Goebel, H. H., Sewry, C. A., Abbs, S., Mohammed, S., Josifova, D., Gautel, M., Jungbluth, H. (2013): Recessive mutations in EPG5 cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy. *Nat Genet*, 45, 83-87

da Costa Martins, P. A., Salic, K., Gladka, M. M., Armand, A. S., Leptidis, S., el Azzouzi, H., Hansen, A., Coenen-de Roo, C. J., Bierhuizen, M. F., van der Nagel, R., van Kuik, J., de Weger, R., de Bruin, A., Condorelli, G., Arbones, M. L., Eschenhagen, T., De Windt, L. J. (2010): MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nature cell biology*, 12, 1220-1227

Dorn, G. W., 2nd, Robbins, J., Sugden, P. H. (2003): Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation research*, 92, 1171-1175

Drazner, M. H., Rame, J. E., Marino, E. K., Gottdiener, J. S., Kitzman, D. W., Gardin, J. M., Manolio, T. A., Dries, D. L., Siscovick, D. S. (2004): Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 43, 2207-2215

Eble, D. M., Spragia, M. L., Ferguson, A. G., Samarel, A. M. (1999): Sarcomeric myosin heavy chain is degraded by the proteasome. *Cell and tissue research*, 296, 541-548

Everett, A. W., Sinha, A. M., Umeda, P. K., Jakovcic, S., Rabinowitz, M., Zak, R. (1984): Regulation of myosin synthesis by thyroid hormone: relative change in the alpha- and beta-myosin heavy chain mRNA levels in rabbit heart. *Biochemistry*, 23, 1596-1599

Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995): Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *The Journal of cell biology*, 131, 1435-1452

Ferdous, A., Battiprolu, P. K., Ni, Y. G., Rothermel, B. A., Hill, J. A. (2010): FoxO, autophagy, and cardiac remodeling. *Journal of cardiovascular translational research*, 3, 355-364

Finocchi, A., Angelino, G., Cantarutti, N., Corbari, M., Bevivino, E., Cascioli, S., Dionisi-Vici, C. (2012). Immunodeficiency in Vici syndrome: a heterogeneous phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158(2), 434-439

Goldberg, A. L. (2003): Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426, 895-899

Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36, 59-74

Gupta, M. P. (2007): Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 43, 388-403

Gutierrez, M. G., Munafo, D. B., Beron, W., Colombo, M. I. (2004): Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of cell science*, 117, 2687-2697

Ha, T., Li, Y., Gao, X., McMullen, J. R., Shioi, T., Izumo, S., Kelley, J. L., Zhao, A., Haddad, G. E., Williams, D. L. (2005): Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting

both mTOR and NF κ B activation in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1570-1580

Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., Lippincott-Schwartz, J. (2010): Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141, 656-667

Harrington, W., Rodgers, M. (1984): Myosin. *Annual review of biochemistry*, 53, 35-73

He, C., Klionsky, D. J. (2009): Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43, 67-93

Herron, T., Baghai, M, Chaturvedi, R & Kentish, JC. (2005): Age dependence of isometric crossbridge cycling and alpha-MyHC isoform expression in human ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, 88, 482A - 482A

Hill, J. A. (2011): Autophagy in cardiac plasticity and disease. *Pediatr Cardiol*, 32, 282-289

Huang, J., Klionsky, D. J. (2007): Autophagy and human disease. *Cell Cycle*, 6, 1837-1849

Hwang, J. J., Allen, P. D., Tseng, G. C., Lam, C. W., Fananapazir, L., Dzau, V. J., Liew, C. C. (2002): Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure. *Physiological genomics*, 10, 31-44

Izumo, S., Lompre, A. M., Matsuoka, R., Koren, G., Schwartz, K., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1987): Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *The Journal of clinical investigation*, 79, 970-977

Izumo, S., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1988): Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 339-343

Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E. L. (2004): Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, 117, 4837-4848

James, J., Martin, L., Krenz, M., Quatman, C., Jones, F., Klevitsky, R., Gulick, J., Robbins, J. (2005): Forced expression of alpha-myosin heavy chain in the rabbit ventricle results in cardioprotection under cardiomyopathic conditions. *Circulation*, 111, 2339-2346

Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R., Neefjes, J. (2001): The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current biology : CB*, 11, 1680-1685

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T. (2000): LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p,

is localized in autophagosome membranes after processing. The EMBO journal, 19, 5720-5728

Kanamori, H., Takemura, G., Maruyama, R., Goto, K., Tsujimoto, A., Ogino, A., Li, L., Kawamura, I., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Nagashima, K., Fujiwara, T., Fujiwara, H., Seishima, M., Minatoguchi, S. (2009): Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. Am J Pathol, 174, 1705-1714

Kariya, K.-i., Karns, L. R., Simpson, P. C. (1994): An enhancer core element mediates stimulation of the rat beta-myosin heavy chain promoter by an alpha 1-adrenergic agonist and activated beta-protein kinase C in hypertrophy of cardiac myocytes. Journal of Biological Chemistry, 269, 3775-3782

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., Ohsumi, Y. (2000): The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. The Journal of cell biology, 151, 263-276

Kiss, H., Yang, Y., Kiss, C., Andersson, K., Klein, G., Imreh, S., Dumanski, J. P. (2002): The transcriptional map of the common eliminated region 1 (C3CER1) in 3p21.3. Eur J Hum Genet, 10, 52-61

Klionsky, D. J., Emr, S. D. (2000): Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science, 290, 1717-1721

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., Chiba, T. (2005): Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. The Journal of cell biology, 169, 425-434

Kostin, S., Pool, L., Elsasser, A., Hein, S., Drexler, H. C., Arnon, E., Hayakawa, Y., Zimmermann, R., Bauer, E., Klovekorn, W. P., Schaper, J. (2003): Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. Circulation research, 92, 715-724

Kuhn, C., Boeck, L., Hille, S., Dierck, F., Eschenhagen, T., Frey, N. (2014): Autophagy is Regulated by mir-106b in the Heart. Circulation, 130, A14035-A14035

Kuhn, C., Mack, C., Schmack, M., Katus, H. A., Frey, N. (2012): FYCO1 Deficiency Blunts Cardiac Autophagy in vivo. Circulation, 126, A13833

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., Mizushima, N. (2004): The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature, 432, 1032-1036

Levy, D., Anderson, K. M., Savage, D. D., Kannel, W. B., Christiansen, J. C., Castelli, W. P. (1988): Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham Heart Study. Annals of internal medicine, 108, 7-13

Litten, R. Z., Martin, B. J., Low, R. B., Alpert, N. R. (1982): Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. Circulation research, 50, 856-864

Lompre, A. M., Mercadier, J. J., Wisnewsky, C., Bouveret, P., Pantaloni, C., D'Albis, A., Schwartz, K. (1981): Species- and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Developmental biology*, 84, 286-290

Lompre, A. M., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1984): Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *The Journal of biological chemistry*, 259, 6437-6446

Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B., Sadoshima, J. (2007): Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circulation research*, 100, 914-922

McMullen, J. R., Sherwood, M. C., Tarnavski, O., Zhang, L., Dorfman, A. L., Shioi, T., Izumo, S. (2004): Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*, 109, 3050-3055

McNally, E. M., Kraft, R., Bravo-Zehnder, M., Taylor, D. A., Leinwand, L. A. (1989): Full-length rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences. Comparisons suggest a molecular basis for functional differences. *Journal of molecular biology*, 210, 665-671

Menke, M., Schmidt, I., Dierck, F., Hille, S., Lüllmann-Rauch, R., Frey, N., Kuhn, C. (2017): Cardiac specific overexpression of FYCO1 in vivo induces autophagy and blunts cardiac dysfunction due to pressure overload. *Clinical Research in Cardiology*, 106, Suppl: 1, P392, DOI: 10.1007/s00392-017-1105-2

Miyata, S., Minobe, W., Bristow, M. R., Leinwand, L. A. (2000): Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circulation research*, 86, 386-390

Mizushima, N., Komatsu, M. (2011): Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147, 728-741

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., Ohsumi, Y. (2004): In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*, 15, 1101-1111

Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., Olson, E. N. (1998): A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93, 215-228

Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N., Otsu, K. (2007): The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature medicine*, 13, 619-624

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. (2009): Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, 458-467

- Nemchenko, A., Chiong, M., Turer, A., Lavandero, S., Hill, J. A. (2011): Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 51, 584-593
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., Murphy, L. O. (2009): Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, 136, 521-534
- Nishida, K., Kyo, S., Yamaguchi, O., Sadoshima, J., Otsu, K. (2009): The role of autophagy in the heart. *Cell Death & Differentiation*, 16, 31-38
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J. E., Oh, S. J., Koga, Y., Sue, C. M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., DiMauro, S., Hirano, M. (2000): Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*, 406, 906-910
- Noda, N. N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F. (2008): Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 13, 1211-1218
- Olsvik, H. L., Lamark, T., Takagi, K., Larsen, K. B., Evjen, G., Overvatn, A., Mizushima, T., Johansen, T. (2015): FYCO1 Contains a C-terminally Extended, LC3A/B-preferring LC3-interacting Region (LIR) Motif Required for Efficient Maturation of Autophagosomes during Basal Autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 290, 29361-29374
- Pankiv, S., Alemu, E. A., Brech, A., Bruun, J. A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjorkoy, G., Johansen, T. (2010): FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *The Journal of cell biology*, 188, 253-269
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., Johansen, T. (2007): p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 282, 24131-24145
- Pankiv, S., Johansen, T. (2010): FYCO1: Linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors. *Autophagy*, 6,
- Parker, T. G. (1995): Molecular biology of myocardial hypertrophy and failure: gene expression and trophic signaling. *New Horiz*, 3, 288-300
- Pfeifer, U., Föhr, J., Wilhelm, W., Dämmrich, J. (1987): Short-term inhibition of cardiac cellular autophagy by isoproterenol. *Journal of molecular and cellular cardiology*, Volume 19, Pages 1179–1184
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., Levine, B. (2003): Promotion of

tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation*, 112, 1809-1820

Razeghi, P., Essop, M. F., Huss, J. M., Abbasi, S., Manga, N., Taegtmeyer, H. (2003): Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain iso-gene expression in rat heart. *Biochemical and biophysical research communications*, 303, 1024-1027

Reiser, P. J., Portman, M. A., Ning, X. H., Schomisch Moravec, C. (2001): Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280, H1814-1820

Rupp, H. (1989): Differential effect of physical exercise routines on ventricular myosin and peripheral catecholamine stores in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation research*, 65, 370-377

Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L. K., Keller, G. A., Subramani, S. (1998): Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *The Journal of cell biology*, 141, 625-636

Shintani, T., Huang, W. P., Stromhaug, P. E., Klionsky, D. J. (2002): Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Developmental cell*, 3, 825-837

Solomon, V., Goldberg, A. L. (1996): Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *The Journal of biological chemistry*, 271, 26690-26697

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2015): Sterbefälle 2015 nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10, bezogen am 05.02.2018 von <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>

Subramaniam, A., Jones, W. K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., Robbins, J. (1991): Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 266, 24613-24620

Swedberg, K., Cleland, J., Dargie, H., Drexler, H., Follath, F., Komajda, M., Tavazzi, L., Smiseth, O. A., Gavazzi, A., Haverich, A., Hoes, A., Jaarsma, T., Korewicki, J., Levy, S., Linde, C., Lopez-Sendon, J. L., Nieminen, M. S., Pierard, L., Remme, W. J. (2005): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *European heart journal*, 26, 1115-1140

Swynghedauw, B. (1999): Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews*, 79, 215-262

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von Figura, K., Saftig, P. (2000): Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406, 902-906

- Tang, H. W., Wang, Y. B., Wang, S. L., Wu, M. H., Lin, S. Y., Chen, G. C. (2011): Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *The EMBO journal*, 30, 636-651
- Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., Kominami, E. (2005): Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1, 84-91
- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E. (2004): LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36, 2503-2518
- Tanida, I., Waguri, S. (2010): Measurement of autophagy in cells and tissues. *Methods Mol Biol*, 648, 193-214
- Tooze, S. A., Yoshimori, T. (2010): The origin of the autophagosomal membrane. *Nature cell biology*, 12, 831-835
- Tsukada, M., Ohsumi, Y. (1993): Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 333, 169-174
- VanBuren, P., Harris, D. E., Alpert, N. R., Warshaw, D. M. (1995): Cardiac V1 and V3 myosins differ in their hydrolytic and mechanical activities in vitro. *Circulation research*, 77, 439-444
- Velden, J. v. d., Moorman, A., Stienen, G. (1998): Age-dependent changes in myosin composition correlate with enhanced economy of contraction in guinea-pig hearts. *The Journal of Physiology*, 507, 497-510
- Ward, W. W. (1981): Properties of the coelenterate green-fluorescent proteins. DeLuca MA, McElroy WD. (eds), *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications.*, pp. 235-242
- Wiese, S., Breyer, T., Dragu, A., Wakili, R., Burkard, T., Schmidt-Schweda, S., Fuchtbauer, E. M., Dohrmann, U., Beyersdorf, F., Radicke, D., Holubarsch, C. J. (2000): Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium: influence of angiotensin II and diastolic fiber length. *Circulation*, 102, 3074-3079
- Winegrad S, M. G., Weisberg A, Lin LE, Weindling S, Horowitz R. (1987): Beta-adrenergic regulation of cardiac myosin. *Can J Physiol Pharmacol.*, Apr;65(4), 606-609
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., Williams, P. M. (1999): Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical biochemistry*, 270, 41-49
- World Health Organization (2012). "The top 10 causes of death." bezogen am 10.02.2016 von <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
- Xie, Z., Nair, U., Klionsky, D. J. (2008): Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular biology of the cell*, 19, 3290-3298

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., Tashiro, Y. (1998): Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function*, 23, 33-42

Yang, Z., Klionsky, D. J. (2010): Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*, 22, 124-131

Zhao, H., Zhao, Y. G., Wang, X., Xu, L., Miao, L., Feng, D., Chen, Q., Kovacs, A. L., Fan, D., Zhang, H. (2013): Mice deficient in Epg5 exhibit selective neuronal vulnerability to degeneration. *The Journal of cell biology*, 200, 731-741

Zhu, H., Tannous, P., Johnstone, J. L., Kong, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Le, V., Levine, B., Rothermel, B. A., Hill, J. A. (2007): Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *The Journal of clinical investigation*, 117, 1782-1793

Anhänge

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Herzmechanik nach Laplace.	2
Abbildung 1-2:	Verschiedene Mechanismen der Autophagie (Mizushima und Komatsu 2011).	4
Abbildung 1-3:	Autophagie Aktivität und ihre Auswirkungen (Ferdous et al. 2010).	5
Abbildung 1-4:	Die Bildung eines Autophagosoms (Mizushima und Komatsu 2011).	6
Abbildung 1-5:	Beziehung von Autophagie-Aktivität und myokardialer Funktion (Nemchenko et al. 2011).	9
Abbildung 1-6:	Autophagie-Aktivität bei moderater Nachlasterhöhung (Nishida et al. 2009).	10
Abbildung 1-7:	Mögliche FYCO1-Funktion als Bindungspartner der Kinesine (Pankiv et al. 2010).	12
Abbildung 1-8:	In vitro Überexpression von FYCO1 in NRVCN (Kuhn et al. 2014).	14
Abbildung 1-9:	Messung des autophagischen Flux mittels Bafilomycin A1 in vitro (Kuhn et al. 2014).	15
Abbildung 3-1:	Vektorkarte und Fyco1-Einsatz zur Klonierung.	49
Abbildung 3-2:	Genotypisierung der Nachkommen.	50
Abbildung 3-3:	Fyco1-Expression der Linie A und Linie F.	51
Abbildung 3-4:	Morphologie der Tierlinien in der Basischarakterisierung.	52
Abbildung 3-5:	Echokardiographische Vermessung am Beispiel zweier Tiere aus Linie F.	53
Abbildung 3-6:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Sirius Red/Fast Green Kollagenfärbung am Beispiel der Linie F.	55
Abbildung 3-7:	Immunhistochemische Darstellung des α -Actinin aus Linie F.	55
Abbildung 3-8:	Zellgrößenbestimmung der Linie A und Linie F.	56
Abbildung 3-9:	RNA-Expression der Linie F.	57
Abbildung 3-10:	Darstellung des GFP-LC3 in der Basischarakterisierung.	58
Abbildung 3-11:	Quantifizierung der Autophagie nach immunologischer Darstellung des GFP-LC3.	59
Abbildung 3-12:	Bilder der Kardiomyozyten aus dem Papillarmuskel eines Fyco1- transgenen Tieres und einer Wildtyp-Maus unter dem Elektronenmikroskop.	59
Abbildung 3-13:	Proteinexpression im Herzen der Fyco1-TG Linien.	61
Abbildung 3-14:	Morphologie der Linie F im Alter von einem Jahr.	63
Abbildung 3-15:	Proteinexpression der Linie F im Alter von einem Jahr.	64
Abbildung 3-16:	RNA-Expression der Fyco1-transgenen Tiere im Alter von einem Jahr.	65
Abbildung 3-17:	Morphologie der Tiere nach Scheinoperation oder aortaler Konstriktion.	67
Abbildung 3-18:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Herzen mit und ohne aortale Konstriktion.	68
Abbildung 3-19:	Darstellung der Sarkomerstruktur mit und ohne aortale Konstriktion.	68

Abbildung 3-20: Wichtige echokardiographisch ermittelte Parameter im Balkendiagramm.	71
Abbildung 3-21: RNA-Expression der Herzen mit und ohne aortale Konstriktion.....	72
Abbildung 3-22: Proteinexpression im Herzen nach Scheinoperation bzw. aortaler Konstriktion.	73
Abbildung 3-23: Expression von β MHC (MYH7) nach Scheinoperation und aortaler Konstriktion.	74
Abbildung 3-24: Co-IP von FYCO1 und MYH7.	75
Abbildung 4-1: MHC Isoformen. Strukturelle Anordnung und Regulation (Gupta 2007). ...	78
Abbildung 4-2: Mögliche FYCO1-Funktion als Bindungspartner der Kinesine (Pankiv et al. 2010).	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Konzentration der Antibiotika.....	25
Tabelle 2.2:	Zellzahl bei der Aussaat der HEK 293-A Zellen zur Protein-Isolierung.	26
Tabelle 2.3:	Transfektionsschema mit Lipofectamine™ 2000 in HEK 293-A Zellen.	27
Tabelle 2.4:	Schema eines PCR-Ansatzes.	30
Tabelle 2.5:	Standardprogramm eines Thermocyclers für eine PCR.	31
Tabelle 2.6:	Schema für den PCR-Ansatz der Klonierungs-PCR.	31
Tabelle 2.7:	Touchdown-PCR für die Klonierung.	31
Tabelle 2.8:	Schema für den PCR-Ansatz der Kolonie-PCR.	32
Tabelle 2.9:	Touchdown-PCR für die Kolonie-PCR.	32
Tabelle 2.10:	Schema für den PCR-Ansatz der Fyco1-PCR.	32
Tabelle 2.11:	Touchdown-PCR für die Fyco1-PCR.	32
Tabelle 2.12:	Schema für den PCR-Ansatz der LC3-PCR.	33
Tabelle 2.13:	PCR für die LC3-Genotypisierung.	33
Tabelle 2.14:	Sall-Verdau.	33
Tabelle 2.15:	HindIII-Verdau.	34
Tabelle 2.16:	NotI-HF™-Verdau.	34
Tabelle 2.17:	Ligation der Sall-verdauten DNA-Fragmente im Verhältnis 1:3 (Vektor:Einsatz).	34
Tabelle 2.18:	Reaktionsansatz für die Multiplex qRT-PCR.	38
Tabelle 2.19:	Programm für die Multiplex qRT-PCR.	38
Tabelle 2.20:	Angaben zur Herstellung eines Trenngels.	41
Tabelle 2.21:	Angaben zur Herstellung eines Sammelgels.	41
Tabelle 2.22:	Transfektionsansätze für Co-IP von Fyco1 und MYH7.	42
Tabelle 3.1:	Echokardiographie der Basischarakterisierung.	54
Tabelle 3.2:	Echokardiographie der gealterten Tiere.	63
Tabelle 3.3:	Funktionelle Parameter der Echokardiographie mit und ohne aortale Konstriktion.	69
Tabelle 3.4:	Echokardiographisch ermittelte Volumina des linken Ventrikels mit und ohne aortale Konstriktion.	70
Tabelle 3.5:	Echokardiographisch ermittelte Durchmesser des linken Ventrikels mit und ohne aortale Konstriktion.	70

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. Frey für eine beispiellose Unterstützung über die Grenzen dieser Doktorarbeit hinaus. Vielen Dank, dass Sie mir den Weg meiner Karriere geebnet und sich stets für mich eingesetzt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Christian Kuhn für das Überlassen dieses anspruchsvollen Themas, die vielen wertvollen konzeptionellen Ratschläge und Korrekturvorschläge sowie die Zeit, die er trotz seiner starken Einbindung in den Klinikalltag für mich gefunden hat bedanken.

Für die engagierte Betreuung und die tolle Zusammenarbeit im Labor danke ich allen Mitarbeitern der Molekularen Kardiologie - vor allem Franziska Dierck und Susanne Hille. Ihr wurdet mit Fragen gelöchert und standet mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Danke für die wertvollen Anregungen und die unvergleichliche Motivation.

Mein herzlichster Dank geht an Joris Greiwe, der immer ein offenes Ohr für mich hat. Ich danke dir für deine Hilfe, dein Verständnis und deine Geduld, die du für meine Arbeit aufbringst.

Meiner Familie, insbesondere Meiner Mutter, danke ich für die grenzenlose Unterstützung in allem was ich tue und wer ich bin.